

# 閉塞性腎症の研究 - アンジオテンシンIIの果たす役割と薬物治療の可能性について

著者	石戸谷 滋人
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54947">http://hdl.handle.net/10097/54947</a>

博士論文

## 閉塞性腎症の研究

アンジオテンシン II の果たす役割と薬物治療の可能性について

東北大学医学部泌尿器科学教室

石戸谷滋人



博士論文

## 閉塞性腎症の研究

アンジオテンシン II の果たす役割と薬物治療の可能性について

東北大学医学部泌尿器科学教室

石戸谷滋人



## 要約

尿路の通過障害によってもたらされる腎臓の機能的、器質的变化は閉塞性腎症と称され、尿細管間質領域の線維化を主徴とし、最終的には腎不全へと至る。我々のこれまでの研究により、閉塞腎において亢進しているレニン-アンジオテンシン系(RAS)がtransforming growth factor- $\beta$  1(TGF- $\beta$  1)を介して細胞外基質の沈着=間質領域の線維性変化を導いていることが明らかとなった。

本研究の前半では、亢進したRASの如何なるポイントが線維性の変化をもたらすのかを明らかにするため、ラットに片側尿管閉塞(UUO)モデルを作成、angiotensin converting enzyme阻害剤(ACE阻害剤)と特異的アンジオテンシン II 受容体拮抗剤(AT-1R)を投与し、腎の線維性変化のパラメーターである間質の相対ボリューム、proliferating cell nuclear antigen(PCNA)陽性核、 $\alpha$  smooth muscle actin( $\alpha$  SMA)とタイプIVコラーゲン(コラーゲン IV)蛋白の沈着、単球/マクロファージの組織浸潤を検討した。さらにTGF- $\beta$  1 及びコラーゲン IV mRNAレベルを検索、両薬剤の効果を比較検討した。その結果、単球/マクロファージ浸潤を除き両者は同様の線維性変化の軽減作用を示したことから、閉塞腎の線維性変化は主として上昇したアンジオテンシン II そのものによってもたらされることが明らかとなった。



本研究の後半では、実際の臨床の病態に即して、既に進行した閉塞腎の線維性変化に対しても、アンジオテンシンⅡレベルを低下させる遅延型の治療が有効か否かを、ラットUUOモデルを用いて検証した。結果は、ある程度時期が過ぎてから治療を開始しても前述の腎の線維性変化のパラメーターを低下させることが可能であった。

以上より、閉塞性腎症の症例に対するACE阻害剤もしくは特異的アンジオテンシンⅡ受容体拮抗剤の投与は、今後臨床の場においても応用が期待される有望な薬理学的手段と考えられた。



## 研究背景

尿路の通過障害による腎障害は閉塞性腎症とも呼ばれ、日常の臨床上きわめて頻繁に遭遇する病態である。その要因としては、幼小児期では先天性奇形、特に先天性水腎症が最も多く、成長して青年期になると尿路結石に因るものが圧倒的に多くなる。中高年期に入ると腫瘍性病変、具体的には前立腺肥大症や尿管腫瘍等の尿路内腔を占拠するものと消化管や女性性器等の腫瘍による尿路外からの圧迫によるものの比率が高まってくる<sup>1)</sup>。この尿路の通過障害は構造的には尿路の拡張、即ち水腎症という形態をとり、機能的には腎機能の緩やかな、しかし確実な低下が生じる。それは間質領域の炎症、線維化という形で強く現れ、糸球体の病変は末期になるまでさほど顕著ではない<sup>2)</sup>。しかし、全体の糸球体濾過率(GFR)は残存する個々のネフロンのGFR(=SNGFR)が代償的に増加するために、表面上は総腎機能が低下したようには現れないが、わずか短期間の閉塞も機能するネフロンの不可逆的減少を来す<sup>3)</sup>。閉塞性腎症は、長期間の放置や無治療により最終的には罹患腎の機能廃絶へと至るものである<sup>4)</sup>。

我が国では1994年末現在約14万3千人が慢性腎不全として血液浄化を含む種々の治療を受けており、その原疾患として閉塞性腎症の占める比率は0.4%、565人とさほど多くはない<sup>5)</sup>。しかし米国では人口10万人あたり350人以上もの人々が閉塞性腎症に罹患していると報告されてお



り、かつ1990年までの3年間に治療を受けた末期腎不全患者16万人中、2.5%に相当する約4千人は閉塞性腎症によるとされている<sup>6)</sup>。間質性腎炎も同様に間質の炎症性病変を主体とし、数多くの患者が罹患している<sup>6)</sup>。各種の糸球体性腎疾患も末期には間質病変＝尿細管間質の線維化を伴ってくることは広く知られており<sup>7,8)</sup>、間質病変の重要性はますます注目されてきている<sup>9)</sup>。

近年の生化学及び分子生物学の進歩発展は、慢性腎不全へと至る多くの腎疾患及びその実験モデルにおける研究を通じて、発症の引き金は各々異なっても途中からは共通のプロセスを経て機能廃絶へ至ることを強く示唆している。具体的な事象としては、糸球体及び尿細管間質でのマクロファージの凝集<sup>10,11)</sup>、炎症性サイトカインや Growth Factor の過剰分泌<sup>12,13)</sup>、細胞外基質の増生と組織の線維化<sup>14,15,16)</sup>等が挙げられ、どれも程度の差こそあれ、慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症等においても同様に観察されている。閉塞性腎症の病理生理学的メカニズムを明らかにすることは単にこの疾患のみならず、慢性腎不全の本態に通ずるものとして有意義であると考えられる。



## 研究目的

我々は既に、ラット閉塞腎に angiotensin converting enzyme阻害剤(ACE阻害剤)であるエナラプリルを投与し、transforming growth factor- $\beta$  1(TGF- $\beta$  1)の発現が低下することを示した<sup>17)</sup>。TGF- $\beta$  1は、尿細管間質の線維化の重要な要素の一つである細胞外基質の蓄積を段階的に準備するといわれる<sup>18,19)</sup>。我々はさらに、ラット閉塞腎にエナラプリルを投与することにより、閉塞腎間質領域での主要な細胞外基質であるタイプIVコラーゲン(コラーゲン IV)を減少させうることも明らかにした<sup>20)</sup>。ACE阻害剤投与はサイクロスポリン腎症<sup>21)</sup>、アミノヌクレオシド腎症<sup>22)</sup>においても、増大した尿細管間質領域のボリュームを軽減し、尿細管間質のダメージを改善すると報告されている。また、一方では血管平滑筋の障害モデル<sup>23,24)</sup>や近位尿細管由来の細胞培養モデル等<sup>25)</sup>による研究を端緒に、広く腎組織においてアンジオテンシン IIがTGF- $\beta$ 産生に直接的に関わっていることが明らかとなってきた<sup>26,27)</sup>。

このように、これまでの閉塞性腎症や他の間質性疾患に関する研究の蓄積は、これらの疾患の主たる病理学的生理学的変化は、活性化されたレニン-アンジオテンシン系の様々の効果によって生じていることを示している<sup>28,29,30)</sup>。レニン-アンジオテンシン系による細胞外基質の増生作用は、エイコサノイド産生の増加等種々の要因によると



ころがある<sup>30)</sup>としても、このような線維性変化における主役はTGF- $\beta$ であろうことが推定される。

本研究の狙いは、まず、レニン-アンジオテンシン系の如何なるポイントが閉塞性腎症における間質領域の線維性変化をもたらしているのかを明確にすることである。

ACE阻害剤は本来的に降圧剤であり、全身のみならず腎局所の血流動態を変化させる<sup>32)</sup>。また、ACE阻害剤はキニナーゼ II の作用を抑制することによりブラジキニンのレベルを上昇させることも広く知られている<sup>32)</sup>。我々は、このように多彩な作用を有するACE阻害剤ではあるが、腎の線維性変化の抑制効果はやはりアンジオテンシン II レベルを低下させることによってもたらされるのであろうと推論した。この仮説に基づき、ラット閉塞腎に対して特異的アンジオテンシン II 受容体拮抗剤を投与して直接的にアンジオテンシン II の作用をブロックし、遺伝子レベル、蛋白質レベルでACE阻害剤による効果と比較検討した。

従来より臨床の場における閉塞性腎症の治療は、機械的な閉塞の解除が第一選択とされている<sup>3,34)</sup>。しかし診断が下るまでに既にかかなりの時間が経過し、機能低下が進行している症例も少なくなく、また、診断確定後も原疾患の性質及び患者本人の全身状態などから観血的治療が行い得ない場合も多い。このような症例に対し、保存的治療により疾患の進行の抑制が可能であれば、閉塞性腎症に対する新たな治療手段として大いに期待し得るものであると考



える。

本研究の最終的な目的は、尿細管間質の線維性変化による腎機能障害を遅延させ、さらには改善させうる薬理学的治療手段を見いだすことである。

実験動物として、体重が180g以上で210gを超えないものを使用した。ラットの一部に片側尿管閉塞 (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO) を作成した。ハロセン吸入麻酔下に開腹し、左尿管を4-0絹糸で2ヶ所結紮、その間を切斷した (以下、UUOラット)。対照群のラットに対して、同様の麻酔下に開腹し左尿管を把持したのみをシャム手術を行った (以下、シャムラット)。これらのラットはバントバルビタール麻酔 (5.0mg/kg、腹腔内投与) 下に尿管結紮と切斷を經過の後に屠殺した。

治療群として、血管性アンジオテンシンII受容体拮抗薬であるSC-51316 (Searle, Skokie, IL, USA) 35,36) 及びACE阻害薬であるエナラプリル (Sigma, St. Louis, MO, USA) をそれぞれ飲料水内に溶解 (SC-51316: 20mg/l、エナラプリル: 200mg/l) し、UUOラット (N=10)、シャムラット (N=10) に手術後日より閉塞5日目の屠殺日まで投与した。無治療群のラットとして、普通飲料水の代わりに水道水を用い期間投与したものを用意した (N=10)。

#### ○血圧及び血漿レニン活性測定

血圧は閉塞後第6日間のUUOラットで、治療群、未治療



## 実験その1

### 研究方法

#### ◎動物実験計画

本実験においては全て、Sprague-Dawley ラットの雌、重量が180 g 以上で210 g を越えないものを使用した。ラットの一部に片側尿管閉塞 (Unilateral Ureteral Obstruction:UUO) を作成した。ハロセン吸入麻酔下に開腹し、左尿管を4-0絹糸で2ヶ所結紮、その間を切断した (以下、UUO ラット)。対照群のラットに対して、同様の麻酔下に開腹し左尿管を把持したのみのシャム手術を行った (以下、シャムラット)。これらのラットはペントバルビタール麻酔 (5.0mg/kg、腹腔内投与) 下に閉塞期間5日間を経過の後に屠殺した。

治療群として、特異的アンジオテンシン II 受容体拮抗剤であるSC-51316 (Searle, Skokie, IL, USA) <sup>35,36</sup> 及びACE阻害剤であるエナラプリル (Sigma, St. Louis, MO, USA) をそれぞれ飲料水内に溶解 (SC-51316 : 20mg/L、エナラプリル : 200mg/L) し、UUOラット(N=10)、シャムラット(N=10)に手術前日より閉塞5日目の屠殺日まで投与した。無治療群のラットとして、薬液飲料水の代わりに水道水を同じ期間投与したものを用意した(N=10)。

#### ◎血圧及び血漿レニン活性測定

血圧は閉塞期間5日間のUUOラットで、治療群、未治療



群でそれぞれ測定した。ラットを短時間のうちにハロセン吸入麻酔で眠らせ、PE-50 カテーテルを左大腿動脈に留置した。30分経過し、麻酔から完全に覚醒したことを確認の上、平均動脈圧 (MAP) を留置カテーテルに接続した圧トランスデューサー (Weco VT-1, Winston Electronics, Millbare, CA, USA) にて3回連続して測定した。ヘパリン化血漿を屠殺直前のラットより採取し、 $-70^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。このサンプルより血漿レニン活性を、DuPont 社の測定用キット (DuPont, Boston, MA, USA) を用いて測定した。

#### ◎組織調整及びRNA抽出

ラットをペントバルビタールにて麻酔した。組織形態用のサンプルとして、まずラットを開腹後、Hank's balanced salt solution (HBSS), pH7.2 にて両腎を灌流、血球成分を除去し、組織固定液であるHistochoice (Amresco, Solon, OH, USA) を約10分間かけて緩徐に注入した。次いで両腎をラットより摘出し、長軸方向に垂直に厚さ3mmにスライス、Histochoiceに浸し $4^{\circ}\text{C}$ で4時間経過の後、HBSSにて洗浄、パラフィンに固定した。パラフィン切片は $4\mu\text{m}$ 幅に調整し、アザン-マロリー染色または免疫組織化学へ供した。

RNA抽出用のサンプルとして、同様にHBSSにて灌流後、手早く両腎を摘出し長軸方向にスライスした。これよ



り皮質を切離し、HBSS中で細切後、更にHBSSにて2回洗浄した。全RNAはguanidinium isothiocyanate(RNAzol)法<sup>37)</sup>を用いて抽出した(Cinna/Bioteck, Houston, TX, USA)。全RNAはRNaseを除去した水(Sigma)に溶解し、UV分光光度計にて260nmと280nmの吸光度を測定して重量を換算した。260nmと280nmの吸光度の比( $OD_{260}/OD_{280}$ )が1.9以上のRNAを、後の相補的DNA生成用に供した。

脱パラフィン化した切片は0.05M Tris-HCl緩衝液、pH7.6にて洗浄後、0.1%タイプ1トリプシン(Sigma)に室温で30分浸漬し、抗原性の賦活化を図った。切片はphosphate buffered saline(PBS)にて10分間3回洗浄、PBSに溶解した正常ヤギ血清またはウサギ血清に予め30分間反応させて非特異的結合をブロックしておいた。再びPBSにて10分間3回洗浄した後、室温にて一次抗体と2時間反応させた。使用した一次抗体は単球/マクロファージに対するマウスモノクローナル抗体であるED-1(2000倍希釈、Harlan Bioproducts, Indianapolis, IN, USA)、マウス抗proliferating cell nuclear antigen(PCNA)抗体、マウス抗 $\alpha$  smooth muscle actin( $\alpha$  SMA)抗体(共に100倍希釈、Biogenex, San Ramon, CA, USA)、そしてコラーゲンIVに対するヒツジポリクローナル抗体(40倍希釈、Southan Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA)の4種類である。陰性コントロー



ルとして一次抗体由来動物の血清を使用した。一次抗体と反応後PBSにて3回洗浄、PBSにて500倍に希釈した二次抗体と30分間反応させた。使用した二次抗体はアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗マウスIgG、ヒツジ抗マウスIgM、そしてウサギ抗ヤギIgG(いずれもSigma)である。最後に切片はPBSにて3回洗浄後、ファストレッド/ナフトールにて発色させ検鏡した。

◎間質ボリューム、コラーゲン IV または  $\alpha$  SMA によるマトリックス - スコア、単球/マクロファージ浸潤、そしてPCNA発現による形態学的解析

対象となる腎皮質の間質ボリュームをポイント計測法<sup>38,39)</sup>を用いて相対的ボリューム(Vv)として定量化して表した。アザン - マロリー染色によって同定された尿細管基底膜、糸球体や尿細管間質の膠原線維を、400倍の倍率で連続してかつ重ならぬように写真撮影し、これに格子状の117個のポイント(13×7)を重ね合わせた。各々の写真で、尿細管基底膜や尿細管間質領域に重なるポイントを相対的ボリュームの要素として計測し、ボウマン嚢や尿細管周囲の小血管に重なったポイントは除外した。糸球体と大血管に重なるポイントは予め総ポイントに組み入れなかった。この手法により一個の腎あたり約1400個から2700個のポイントを計測分別し、相対的ボリュームとして評価した。



腎皮質の尿細管間質のマトリックス - スコアは先に金藤等が述べたように、コラーゲン IV または  $\alpha$  SMA の発現によって規定した<sup>20)</sup>。コラーゲン IV または  $\alpha$  SMA によって免疫染色した切片を、400 倍の倍率で重ならぬようにランダムに 20 枚写真撮影し、その発現量に応じてスコア 0 からスコア 3 までの 4 段階に分類した。スコア 0 とは対照群のレベルに相当するものであり、スコアが高いほど尿細管間質が特異的にコラーゲン IV または  $\alpha$  SMA と反応したことを表している。治療群及び無治療群各々 3 匹のラットを用意し、それぞれのスコアを集計、平均化した。

単球/マクロファージの尿細管間質への浸潤度は ED-1 抗体により陽性に染色された細胞数で評価した。各々のラットからの 1 切片よりランダムに選択した 3 視野を 200 倍の倍率で写真撮影し、ED-1 陽性細胞数を計測した。

細胞核内の PCNA を可視化するため、脱パラフィン化した切片を 0.01 N 塩酸にて 10 分間処理して一次抗体への反応性を高めた後、PBS にて洗浄して先に述べた免疫組織化学的検討を行った。

#### ◎ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法による TGF- $\beta$ 1、及びコラーゲン IV mRNA の定量と検討

先に抽出した全 RNA より cDNA cycle kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、オリゴDT プライマーに始ま



る最初の一本鎖相補的DNA(cDNA)を生成した。TGF- $\beta$  1 mRNA及びGAPDHmRNAの生成には2  $\mu$ gの、コラーゲン IVmRNAの生成には4  $\mu$ gの全RNAを使用した。

10  $\mu$ lに調整した全RNAとオリゴDT プライマー1  $\mu$ lの混合液を65°Cで10分間反応させて二次構造を変成させた後氷冷した。この混合液に逆転写酵素(avian myeloblastosis virus, AMV-RT)5単位を含むmaster mix (25mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 10倍緩衝液 2  $\mu$ l, 10mM dNTP 2  $\mu$ l, rRNAse 阻害剤 0.5  $\mu$ l)を添加し、42°Cで1時間保温した後94°Cで5分間加熱、そして氷冷した。

RT-PCR法にはそれぞれ3  $\mu$ lのcDNAを使用し、増幅はPCR緩衝液(50mM KCl, 10mM Tris-HCl)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、それぞれ200  $\mu$ Mに調整したdNTP、オリゴヌクレオチドプライマー、そして1.25単位の耐熱性DNAポリメラーゼから成る、総量50  $\mu$ lの反応液にて行った。プライマー濃度はTGF- $\beta$  1は50pmol、コラーゲン IVは100pmolとした。使用したmRNAの適格性を再確認し、また、RT-PCR法による生成産物の定量比較を行う目的で、同じ由来のcDNA1  $\mu$ lをハウスキーピング遺伝子である glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマー(25pmol)で増幅した。各々のプライマーのデザインは以下の通りである。TGF- $\beta$  1<sup>40)</sup> と GAPDH<sup>41)</sup> のプライマーは既報のラットのシーケンスより、コラーゲン IV<sup>42)</sup> のプライマーは既報のマウスのシー



クエンスより作成した。

TGF- $\beta$  1 : 5'-AATACGTCAGACATTCGGGAAGCA

(sense)

3'-GTCAATGTACAGCTGCCGTACACA

(antisense)

コラーゲン IV : 5'-GTGCGGTTTGTGAAGCACCG(sense)

3'-GTTCTTCTCATGCACACTT(antisense)

GAPDH : 5'-AATGCATCCTGCACCACCAA(sense)

3'-GTAGCCATATTCATTGTCATA(antisense)

PCRの条件は94℃で1分間(変成)、60℃で1分間(アニー  
ル、但しコラーゲン IVは54℃)、そして72℃で2分間(伸  
長)とし、TGF- $\beta$  1は30サイクル、コラーゲン IVは40サ  
イクル、GAPDHは28サイクルの増幅をPerkin-Elmer  
Cetus社のDNA Thermal Cyclerにて行った。これらRT-  
PCR法の条件及び至適サイクル数は既に検討発表した我々  
の手法<sup>17, 20)</sup> に準じた。

増幅終了後それぞれのPCR生成産物15  $\mu$ lを、エチディ  
ウムブロマイド(0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)添加1.2%アガロースゲル上  
に電気泳動した。このゲル上のバンドを一部取り出して精  
製し、TA cloning 法にてシークエンスを行い、この産物  
が目的としたものに合致することを確認している。PCR生  
成産物が展開したゲルはUV光下にポラロイド-タイプ665  
フィルム(Poraroid, Cambridge, MA, USA)にて、同一の露  
出とシャッタースピード条件で撮影し、同一の現像条件で



現像した。条件の均一化を図るため、それぞれ同じcDNA由来である、TGF- $\beta$  1 とGAPDH、コラーゲン IV とGAPDHを同じゲル上で展開し、同時に撮影、現像した。これらのネガティブフィルム上のバンドをデンストメーターにて定量測定(Sepra Scan 2001, Integrated Separation System, Natwick, MA, USA)し、各実験群においてTGF- $\beta$  1 /GAPDH、コラーゲン IV/GAPDHの比で表し、それぞれ比較検討した。

#### ◎統計

得られたデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。RT-PCR法によるデータは対応のないt-検定(Macintosh, Stat-View program)にて分析した。間質の相対的ボリューム(Vv)、ED-1陽性細胞の浸潤、マトリックススコア、血漿レニン活性等の有意差検定はANOVAを用いて解析した。



## 結果

### ◎尿細管間質の定量的形態分析

腎皮質の尿細管間質に占める尿細管基底膜や間質領域の相対的ボリューム(Vv)を%で表し、図1に示した。5日間の無治療UUOラットにおいては対側腎( $8.4 \pm 1.5\%$ )に比して閉塞腎( $38.0 \pm 5.9\%$ )で有意差を以てVvの増加を認めた( $p < 0.0001$ )。

ACE阻害剤エナラプリルまたは特異的アンジオテンシン II 受容体拮抗剤SC-51316を5日間投与したUUOラットでは有意に閉塞腎のVvが低下した(エナラプリル： $p < 0.0001$ 、SC-51316： $p < 0.001$ )。対側腎に関しては無治療群とSC-51316またはエナラプリル治療群との間に有意差を認めなかった。

### ◎血圧及び血漿レニン活性

白色粉末状の非ペプチドであるSC-51316は水に溶解し難く、 $20 \text{ mg/L}$ が溶解の極量であったため、この濃度を本実験で用いた。表1に示した如く、5日間のUUOラットに投与した量のSC-51316( $3 \sim 3.5 \text{ mg/kg/日}$ に相当)は無治療5日間のUUOラットに比して平均動脈圧に影響を与えなかった。これに対して本実験においてはTanaka等<sup>43)</sup>のdoseに倣い比較的高濃度のエナラプリルを飲料水として投与しており( $30 \text{ mg/kg/日}$ に相当)、この群では有意の平均動脈圧の低下を認めた( $p < 0.001$ )。



SC-51316またはエナラプリルを5日間投与したUUOラットでは、両群いずれも無治療5日間のUUOラットに比して有意の血漿レニン活性の上昇が認められた( $p < 0.0001$ )。

#### ◎コラーゲン IV 及び $\alpha$ SMA による免疫組織化学的解析

我々は閉塞腎腎皮質においてコラーゲン I、III、IV 蛋白の発現を検索し、尿細管基底膜の肥厚に伴ってのコラーゲン IV の増生が最も顕著であることを明らかにしており<sup>20</sup>、本実験においてもコラーゲン IV をパラメーターとして用いた。 sham ラットおよび5日間のUUOラット対側腎においてコラーゲン IV は尿細管基底膜、ボーマン嚢、メサングウム領域に観察された(図2-1)。閉塞腎においてはコラーゲン IV 蛋白の発現は増強傾向を示し、特に間質領域での発現が認められた。エナラプリルまたはSC-51316を5日間投与したUUOラット閉塞腎では、両群いずれもコラーゲン IV 蛋白の発現の低下が観察された。

$\alpha$ SMA 蛋白は各種の糸球体疾患においてメサングウム領域で発現することが知られている<sup>44</sup>。Nagle等は既にこのアクチンのアイソフォームの一つである  $\alpha$ SMA が閉塞腎においても線維芽細胞のtransformationに伴って間質領域で強く発現することを明らかにしている<sup>45</sup>。図2-IIに示す如く5日間のUUOラット閉塞腎においては、増大した間質領域の細胞を中心に多くの  $\alpha$ SMA の発現を認めるが、対側腎においては僅かに血管領域に認めるのみであ



る。エナラプリルまたはSC-51316を5日間投与したUUOラットの閉塞腎では、両群いずれも $\alpha$ SMAの発現の著しい低下を認めた。

ACE阻害剤と特異的アンジオテンシン II 受容体拮抗剤が、どの程度閉塞腎において増加したところのコラーゲンIVおよび $\alpha$ SMAの発現を抑制し得るかを表2にマトリックス・スコアーとして定量的に示した。コラーゲンIVに関しては、無治療の閉塞腎では平均 $2.81 \pm 0.08$ であったものが、エナラプリルの投与で $1.85 \pm 0.13$ へ、SC-51316の投与で $1.97 \pm 0.19$ へ、いずれも有意に低下した( $p < 0.002$ )。 $\alpha$ SMAに関しても、平均 $2.47 \pm 0.03$ であったものが、エナラプリルの投与で $0.65 \pm 0.13$ へ、SC-51316の投与で $0.80 \pm 0.18$ へ、同様に有意に低下した( $p < 0.0001$ )。

#### ◎単球/マクロファージ浸潤

以前から述べられている通り<sup>10)</sup>、閉塞腎の腎皮質においてはED-1抗体で陽性に染まる単球/マクロファージの多大の浸潤が観察された(図2-III)。図3に示すようにエナラプリルの投与は、無治療の閉塞腎で1視野あたり $67.9 \pm 3.1$ 個認められたED-1陽性細胞を $10.7 \pm 0.9$ 個まで有意に減少させた( $p < 0.0001$ )。しかし、SC-51316を5日間投与したUUOラットの閉塞腎においては、ED-1陽性細胞数は1視野あたり $63.2 \pm 10.9$ 個と殆ど変化を認めなかった。シャム



ラット、無治療群及び治療群ラットの対側腎ではED-1陽性細胞を殆ど認めなかった。

#### ◎PCNAの発現

UUOラットの閉塞腎において尿細管、間質領域の細胞の核にチミジンが多く取り込まれることが既に報告されている<sup>46)</sup>。本実験ではDNAポリメラーゼ関連の蛋白で、チミジンの取り込みと同様にDNA合成の多寡の指標であるPCNAの、免疫組織化学的な発現を検索した。図2-IVに示すように、閉塞5日目のラットの閉塞腎においてPCNAの発現がシャムラット及び対側腎に比して著しく増大していることを確認した。エナラプリル、SC-51316いずれの投与も、この増大した尿細管、間質領域でのPCNA陽性の核の発現を明らかに減少させている。図4にそれぞれの群の閉塞腎におけるPCNAの発現を尿細管と間質に分けて定量的に示すが、エナラプリル、SC-51316ともに尿細管( $p < 0.002$ )、間質領域( $p < 0.0001$ )でのPCNA陽性の核の個数を有意に減少させた。

#### ◎TGF- $\beta$ 1、及びコラーゲン IV mRNAの発現

我々は既にUUOラット閉塞腎においては、対側腎に比してTGF- $\beta$  1 mRNA及びコラーゲン IV mRNAのレベルが著しく上昇していることを明らかにしている<sup>17,20)</sup>。本実験においてはこの手法に倣って、ACE阻害剤と特異的アンジ



オテンシン II 受容体拮抗剤がこの両者のmRNAレベルに如何なる影響を及ぼすかを検討した。

ACE阻害剤エナラプリルまたは特異的アンジオテンシン II 受容体拮抗剤SC-51316の閉塞期間中の投与はいずれも、無治療UUOラットにおいては著しく上昇しているTGF- $\beta$  1 mRNA及びコラーゲン IV mRNAのレベルを有意に低下させた。

図5に各群におけるTGF- $\beta$  1 のmRNAレベルの比を示すが、SC-51316( $p < 0.0001$ )、エナラプリル( $p < 0.02$ )の投与は明らかにメッセージレベルでの閉塞腎腎皮質におけるTGF- $\beta$  1 の発現を抑制している。

同様に図6に各群におけるコラーゲン IVのmRNAレベルの比を示すが、SC-51316( $p < 0.05$ )、エナラプリル( $p < 0.05$ )の投与は明らかにメッセージレベルでのコラーゲン IVの発現も抑制している。

対側腎に関しては、シャムラット、治療及び無治療の5日間のUUOラットの各群間においてTGF- $\beta$  1、コラーゲン IV mRNAの発現に有意差を認めなかった。



## 実験その2

前実験での結果を踏まえ、実際の臨床の病態に即して、既にある程度の時間経過と共に進行した閉塞腎の線維性変化に対しても、アンジオテンシン II のレベルを低下させることが有効であるか否か、いわゆる遅延型の治療の有効性の有無を、ラットを用いて検証した。

### 研究方法

#### ◎動物実験計画

本実験においても前実験と同様にSprague-Dawley ラットの雌、重量が180 g 以上で228 g を越えないものを使用した。UUO ラットを作成の後、治療群として、閉塞5日間経過の後、5日目より10日目までの後半5日間のみACE阻害剤エナラプリルを飲料水内に溶解（エナラプリル：200mg/L）し投与したもの（以下、遅延型治療ラット、N=10）を、無治療群として閉塞作成後より5日間または10日間水道水を投与したもの（各々N=10）をそれぞれ用意した。対照群のラットとして、シャム手術を行ったもの（以下、シャムラット、N=5）と全く操作を加えなかったもの（以下、コントロールラット、N=5）とを用意した。これらのラットはペントバルビタール麻酔（5.0mg/kg、腹腔内投与）下に所期の日数を経過後に屠殺した。

#### ◎組織の調整及び免疫組織化学的、形態学的検討

前実験と同様の手技に基づいて、まず免疫組織化学用の



切片を作成し、単球/マクロファージに対するED-1抗体、抗 $\alpha$ SMA抗体、そしてコラーゲン IVに対する抗体を用いて各群の腎皮質組織を染色、それらの結果よりED-1陽性細胞数を計測、マトリックス - スコアを算出した。また、アザン - マロリー染色を行い、ポイント計測法を用いて尿細管間質領域の相対的ボリューム(Vv)を定量化して表した。

#### ◎RT-PCR法によるTGF- $\beta$ 1、TIMP-1及びコラーゲン IV mRNAの定量と検討

前実験と同様の手技に基づいて、腎皮質組織よりmRNAを抽出、これよりcDNAを作成しRT-PCR法を用いてメッセージレベルでの変化を検索した。今実験においてはTGF- $\beta$  1、コラーゲン IV mRNAに加えて、細胞外基質の分解酵素(メタロプロテイナーゼ)の阻害剤の一つtissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP-1)のmRNAの増減をも検討した。既報のマウスのシークエンス<sup>47)</sup>より作成したTIMP-1のプライマーは以下の通りであり、プライマー濃度は25pmolとした。3 $\mu$ lのcDNAを使用し、94 $^{\circ}$ C1分間、56 $^{\circ}$ C1分間、そして72 $^{\circ}$ C2分間で1サイクルとし、35サイクルの増幅をDNA Thermal Cyclerにて行った。また、本実験においては、cDNAの質の向上により前実験と同様のサイクル数ではバンドの強度が一部プラトーに達したため、TGF- $\beta$  1に関しては26サイクルの増幅にとど



めた。

TIMP-1 : 5'-GACCTGGTCATAAGGGCTAAA (sense)

3'-GCCCCGTGATGAGAAACTCTTCACT

(antisense)

#### ◎統計

得られたデータは前実験と同様に平均値±標準偏差で表し、対応のないt-検定またはANOVAを用いて解析した。



## 結果

### ◎免疫組織化学的、形態学的検討

図7に見られるように、5日間及び10日間の無治療UUOラットの閉塞腎においては、著しく拡大した間質領域とそれを構成する細胞群の増生が顕著であった。遅れて5日目よりエナラプリルによる治療を開始し10日目に屠殺した遅延型治療のラットでは、間質の多くの領域で細胞密度の減少が認められた。

対照群に比して5日間、10日間の無治療UUOラット閉塞腎は間質領域の相対的ボリューム(Vv)の有意の増加を示したが、5日間と10日間の両群間には有意の差を認めなかった。遅延型治療のUUOラットでは無治療5日間( $p<0.05$ )、無治療10日間( $p<0.01$ )に比して有意にVvの低下が認められた。対照群であるコントロールラットとシャムラットは殆ど等しいVvの値を示した(図8)。

### ◎単球/マクロファージ浸潤

図9に5日間、10日間の無治療UUOラット及び遅延型治療ラットにおけるED-1陽性細胞数を示した。10日間の無治療UUOラットの閉塞腎では5日間のそれに比べて有意にED-1陽性細胞の増加を認めた( $p<0.05$ )。エナラプリルによる遅延型治療ラットの閉塞腎においては10日間の無治療UUOラットに比べてED-1陽性の単球/マクロファージ浸潤の有意の低下が観察された( $p<0.01$ )。治療、無治療群ラット



の対側腎及び対照群を構成するシャムラット、コントロールラットのいずれの間にも有意差は認められなかった。

#### ◎コラーゲン IV及び $\alpha$ SMAによるマトリックス - スコア

前実験において閉塞腎の皮質ではコラーゲン IV蛋白や $\alpha$ SMAが増加すること、これはアンジオテンシン IIのレベルを下げてやることによりその発現が抑制されることを述べた。本実験においても同様にコラーゲン IVと $\alpha$ SMAの免疫組織化学によりマトリックス - スコアを表し、遅延型のアンジオテンシン IIブロッキングによってもこのスコアを低下させうるか否かを検証した。表3に、コラーゲン IV、 $\alpha$ SMAそれぞれによるマトリックス - スコアを示した(対照群はスコア 0である)。

コラーゲン IVによるマトリックス - スコアは、無治療5日間の閉塞腎に比べて無治療10日間の閉塞腎では有意の増加が認められた( $p < 0.02$ )。エナラプリルによる遅延型治療ラットの閉塞腎においては、無治療5日間、10日間のUUOラットのいずれと比較しても有意にマトリックス - スコアが低下していた( $p < 0.05$ )。

$\alpha$ SMAによるマトリックス - スコアは、無治療5日間と無治療10日間のUUOラット閉塞腎の間に有意差を認めなかったが、この両群に比較して遅延型治療ラットの閉塞腎は明らかに有意に低値のスコアを示した( $p < 0.05$ )。



◎RT-PCR法によるTGF- $\beta$  1、TIMP-1及びコラーゲン  
IVmRNAの定量

以前から述べられているのと同様に17)、無治療5日間と10日間のUUOラット閉塞腎においては、それぞれの対側腎、対照群(シャムラット、コントロールラット)に比べて著しいTGF- $\beta$  1 mRNAの増加が認められた( $p < 0.01$ )。また、本実験においては無治療5日間と10日間のUUOラットの対側腎においても対照群に比べて僅かであるが有意のTGF- $\beta$  1 mRNAの増加が観察された( $p < 0.02$ )。

エナラプリルによる遅延型の治療を施したUUOラットにおいては閉塞腎対側腎いずれにおいても、無治療5日間と10日間両群の閉塞腎対側腎と比較して有意差を以て、増加していたTGF- $\beta$  1 mRNAレベルの低下が観察された(図10、閉塞腎： $p < 0.001$ 、対側腎： $p < 0.02$ )。

TIMP-1 mRNAレベルの変化を図11に示す。無治療5日間と10日間のUUOラット閉塞腎においては、対側腎、対照群に比べて著しいTIMP-1 mRNAの増加が認められた( $p < 0.01$ )。無治療5日間と10日間のUUOラット対側腎においても対照群に比べて有意のTIMP-1 mRNAの増加が観察された( $p < 0.01$ )。

遅延型治療のUUOラット閉塞腎においては、無治療5日間と10日間の閉塞腎に比して有意にTIMP-1 mRNAの減少が認められた( $p < 0.001$ )。また対側腎においても遅延型の



治療は無治療10日間の対側腎に比して有意に、上昇していたTIMP-1 mRNAレベルを低下させた( $p < 0.001$ )。

図12に示すように、無治療5日間と10日間のUUOラット閉塞腎においては、対側腎、対照群に比べて著しいコラーゲン IV mRNAの増加が認められた( $p < 0.01$ )。無治療5日間と10日間の対側腎においても、対照群に比べて僅かであるが有意のコラーゲン IV mRNAの増加が観察された( $p < 0.02$ )。

遅延型治療のUUOラット閉塞腎では、無治療10日間の閉塞腎に比して有意にコラーゲン IV mRNAの減少が認められた( $p < 0.05$ )。しかし、TGF- $\beta$  1 mRNAやTIMP-1 mRNAと異なり、遅延型治療を受けた対側腎はコラーゲン IV mRNAの発現に関して、対照群や無治療の対側腎と比較して有意の差を示さなかった。

図13にそれぞれの群におけるTGF- $\beta$  1、TIMP-1及びコラーゲン IV mRNAと、対応するGAPDH mRNAの発現をRT-PCR法によるバンドで示した。



## 考察

アンジオテンシン II は腎臓において血管収縮、尿細管再吸収の調節、腎成長の促進等の作用を示すのみならず、それ自身が走化性誘因物質として作用する等様々な生物化学的効果を発現するものとして注目されている<sup>48)</sup>。アンジオテンシン II の受容体の研究も近年盛んに行われ、哺乳類では分化増殖促進の方向に働くとされ数的にも優勢なタイプ1受容体と、胎生期に主に作用を発現するとされるタイプ2受容体の存在が明らかにされた<sup>49)</sup>。従来までレニン-アンジオテンシン系をブロックさせる上でACE阻害剤に加えてsaralasin等が用いられてきた<sup>50)</sup>が、最近ではアンジオテンシン II 受容体の解明につれてこのようなアンジオテンシン II 類似拮抗物質とは異なり、アゴニスト作用を有さない非ペプチド性の特異的アンジオテンシン II タイプ1受容体拮抗剤(AT-1R)が開発され、種々の実験にそして一部臨床応用へ供されている。本実験で用いたSC-51316<sup>35,36)</sup>もロサルタン<sup>51)</sup>等と同様に、この新たな範疇の降圧剤として開発されたものである。

種々の腎疾患に対するACE阻害剤の投与は蛋白尿の減少に始まり<sup>52)</sup>、糸球体硬化の軽減<sup>43,53,54)</sup>、尿細管間質障害の改善<sup>21,22)</sup>等多くの腎そのものに対する治療的側面が報告されている。ACE阻害剤であるエナラプリルはアンジオテンシン II の生成を抑え、血圧を低下させ、血漿レニン活性を高めるだけでなく、キニナーゼ II の阻害剤でもあ



る。エナラプリルの投与はキニナーゼ II によるキニンの分解を抑制することによりキニン-カリクレイン系を亢進させることにもなる。我々は閉塞性腎症に対してエナラプリルを投与することにより尿細管間質の線維性変化を抑制し得ることを発表してきたが<sup>17,20)</sup>、それは上昇したキニンのレベルや、キニンによって産生が誘導された一酸化窒素 (NO)<sup>55)</sup> による血管拡張性の効果が作用していた可能性もあったのである。

今回の実験ではまず、ラットに5日間の閉塞腎モデルを作成しその形態を観察した。5日間を無治療で経過すると単球/マクロファージの多大な組織浸潤と間質領域の拡大が生ずる。そこにはコラーゲン IVや活性化した線維芽細胞の指標である $\alpha$ SMAが観察され始め、これは間質線維化の初期像とも言うべき線維性の変化が生じていることを表している。ラットの完全尿管閉塞では10日を過ぎる頃より皮質の著しい菲薄化と浮腫のため形態を把握し難くなるが、Sharma等はウサギを用いて16日間<sup>2)</sup>、Nagle等もウサギで32日間まで観察し<sup>45)</sup>、間質の線維化像を報告している。ラットにおける5日間の尿管閉塞は線維化が完成するには不十分ではあるが少なくとも線維性変化を示す種々のパラメーターは確実に増強してきており、後続く薬物治療に対する反応を評価するには十分であると考えられた。この結果をもとに本モデルにおけるアンジオテンシン II の役割を明確にするため、AT-1Rを用いてアンジオテンシン



IIの作用のみをブロックし、その結果をACE阻害剤によるものと形態学的見地から比較した。結果は増大した間質ボリュームの減少、コラーゲンIVや $\alpha$ SMA等の細胞外基質蛋白の沈着の減少が両治療群で同様に観察された。

PCNAは細胞増殖の指標であり、また、DNA修復のプロセスにも関与している<sup>56)</sup>。AT-1Rの投与及びACE阻害剤の投与がPCNA陽性の核を減少させたことは、間質の線維芽細胞や単球/マクロファージ、そして尿細管細胞の増殖を抑制したものと考えられる。AT-1RやACE阻害剤を投与するとタイプ1受容体を介した細胞内情報伝達が抑制され、逆にタイプ2受容体の発現が増強されてくるとの報告が出てきている<sup>57)</sup>。我々も閉塞の時間経過と共に減衰を示すところのラットタイプ2受容体mRNAの発現がACE阻害剤の投与で回復することを確認している<sup>58)</sup>。通常での発現は微量で、分化増殖抑制の方向に作用する<sup>57)</sup>とされるこの受容体のupregulationもACE阻害剤やAT-1RによるPCNA発現の減少=間質の細胞増殖の抑制の一因となると推察される。閉塞腎におけるアンジオテンシンIIブロッキングがPCNAの増減を左右したことは、細胞が過剰に増殖しDNA修復を必要とする状態がアンジオテンシンIIレベルの亢進によってもたらされていると言い得よう。

しかし、予期に反してAT-1Rの投与は間質の線維性変化を抑制したものの、ACE阻害剤の投与で見られたような単球/マクロファージの組織浸潤を減少させる効果を示さな



かった。NOはマクロファージの組織接着を減弱させるという報告があり<sup>59)</sup>、AT-1Rには無いACE阻害剤によるキニン-カリクレイン系の賦活作用がこのようなNOを誘導した可能性がまず考えられる。さらには、ACE阻害剤はアンジオテンシン IIの産生そのものをブロックするがAT-1Rはタイプ1受容体への結合を競合的にブロックするのみであることより、残存するアンジオテンシン IIが引き続き chemoattractantとしてマクロファージを組織にとどめているのかもしれない。それではマクロファージはAT-1R投与下においてもTGF- $\beta$  1をはじめTNF  $\alpha$ 等の炎症性サイトカインを過剰に分泌し続けてしまうのだろうか。

線維性変化の引き金となるTGF- $\beta$  1はどこで産生されるかは議論の分かれるところである。Diamond等は閉塞腎モデルにおいては組織浸潤するマクロファージが産生源であると断じている<sup>60)</sup>が、固有の腎組織もTGF- $\beta$  1産生能を有しており、Utah大学のグループは抗メサングウム血清を投与したラット線維化腎のTGF- $\beta$  1の局在を検索し、メサングウム細胞と間質の線維芽細胞にその発現は観察されたのみでマクロファージには全く認められなかったとしている<sup>61)</sup>。彼らは同様にIn vitro においても培養メサングウム細胞がアンジオテンシン IIの刺激によりマクロファージとは無関係のTGF- $\beta$  1自己分泌を介して細胞外基質を産生することを示している<sup>26)</sup>。TGF- $\beta$  1はLatent TGF- $\beta$  1 binding protein(LTBP)を伴う高分子型潜在型とこれを欠



く低分子型潜在型との形で分泌され、その作用発現に際してはLTBPの存在が必要であるが<sup>62)</sup>、Mizoi等はヒト胃組織のTGF- $\beta$  1とLTBPの局在を検索し、LTBPは線維芽細胞や平滑筋には認められたがマクロファージには存在しなかったと述べている<sup>63)</sup>。本実験で得られた事実—「AT-1Rの投与によって単球/マクロファージの浸潤がほぼ不変であったにもかかわらず閉塞腎の線維性変化がACE阻害剤投与と同様に抑制された」—から、線維性変化を惹起するところのLTBPを伴ったTGF- $\beta$  1は固有の腎組織が主たる産生源であろうと考えられる。

TGF- $\beta$  1はコラーゲン IV等の細胞外基質を直接的に誘導する他に、これら細胞外基質を分解するところのプラスミンやメタロプロテイナーゼの阻害剤(PAI-1, TIMP-1)を増強することによっても更に蓄積を重ねさせるとされている<sup>19)</sup>。本実験では先に述べた形態学的考証を裏付けるべく、RT-PCR法を用いてTGF- $\beta$  1とコラーゲン IVのmRNAレベルを検索した。その結果5日間のラット閉塞腎において上昇したTGF- $\beta$  1 mRNAとコラーゲン IV mRNAは、AT-1Rの投与、ACE阻害剤の投与いずれによっても同様に抑制されることが示された。このことより、閉塞腎においてアンジオテンシン IIの作用を抑制してやると間質の線維性変化を改善させる方向の作用が、遺伝子レベルと蛋白レベルでパラレルに生ずることが確認された。

以上の結果より、「閉塞の発生→レニン-アンジオテン



シン系の亢進→アンジオテンシン II レベルの上昇→TGF- $\beta$  1 mRNAの上昇→細胞外基質の発現増強」といった一連の流れが明らかとなった。本実験の前半では、この一連のプロセスが、使用したAT-1Rの量が血圧に全く影響を与えない低容量であったにもかかわらず、ACE阻害剤の投与と同様に抑制されることが示された。即ち、閉塞性腎症における尿細管間質の線維性変化の進行は主に、亢進したレニン-アンジオテンシン系の中の上昇したアンジオテンシン II そのものによるもので、血圧の変動とは独立したものであることが証明された。

この結果を踏まえて、実際の症例を念頭に置き、これに対応した閉塞性腎症の実験モデルを作成、その治療的效果を実験の後半で検討した。具体的には、ある程度期間が経過して線維性変化が固まった閉塞腎に対して後から追いかけるようにアンジオテンシン II レベルを低下させてやる、いわゆる遅延型治療を施し、腎間質の線維性変化の進行を遅延もしくは抑制させうるかを検索した。

前半で述べたように、5日間の閉塞期間は形態学的に見ても腎間質領域の線維性変化の初期像が確立されてくる期間である。当然のことながら無治療10日間のラット閉塞腎は無治療5日間のそれに比べて、間質ボリューム、マトリックス-スコア、単球/マクロファージ浸潤、TGF- $\beta$  1 mRNA、TIMP-1 mRNA、コラーゲン IV mRNAの、全ての線維性変化のパラメーターでさらなる増加を示した。そ



して、10日間の閉塞期間のうち後半の5日間のみACE阻害剤を投与してやると、これら全てのパラメーターが無治療10日間の値と比較して有意に低下した。しかも間質ボリューム、 $\alpha$ SMAによるマトリックス・スコアー、TGF- $\beta$ 1mRNA、TIMP-1mRNAは無治療5日間の群と比べても有意に低いレベルを示した。このことは遅延型の治療が少なくとも閉塞腎の尿細管間質線維性変化の進行を遅らせ、おそらくさらには改善する作用を有することを強く示唆している。

注目すべきは、UUOラットにおける対側腎の変化である。前半の実験では対照とUUOラット対側腎の間にTGF- $\beta$ 1mRNAとコラーゲンIVmRNAのレベルに関して有意差を認め得なかった。本実験においても対照と比較して組織学的には、言い換えれば蛋白レベルでは対側腎の変化を認めなかったが、遺伝子レベルでは5日間及び10日間のUUOラット対側腎でTGF- $\beta$ 1mRNA、TIMP-1mRNA、コラーゲンIVmRNAの僅かな上昇が観察された。過去にもSharma等<sup>2)</sup>、Diamond等<sup>60)</sup>、Gonzalez-Avila等<sup>64)</sup>が閉塞性腎症の動物実験において対側腎のTGF- $\beta$ 1や細胞外基質の変動について言及しているが、条件設定の差違もあり、変化を認めたもの、認めていないものと一定していない。閉塞期間が長くなり対側腎に代償性の負荷がかかるにつれて何らかの分子レベルでの変化が生じている可能性はあるが、この仕組みの解明は今後の課題である。



## 結論

1. ラットを用いた本実験により、閉塞性腎症における腎機能低下の主要因である尿細管間質の線維性変化は、亢進したアンジオテンシン II レベルによってもたらされることが示された。この線維性変化は、ある程度時期が過ぎてからアンジオテンシン II レベルを低下させてやっても軽減させることが可能であった。ACE阻害剤もしくは特異的アンジオテンシン II 受容体拮抗剤の投与は、臨床の場合において閉塞性腎症の症例に対しても応用が期待される有望な薬理学的手段と考えられた。

4. Gillerwater, J.Y. (1992) The pathophysiology of urinary tract obstruction. In Campbell's urology, 6th ed., W.B. Saunders Publishers, Philadelphia, pp499-532.
5. 日本透析医学会腎臓病委員会 (1995) 透析患者の慢性腎臓病の経過 (1994年12月31日現在). 透析医療, 29, 1-22.
6. United States Renal Data System 1993 Annual Data Report (1993) Incidence and causes of treated ESRD. Am. J. Kidney Dis., 22(Suppl.2), 30-37.
7. Lano, P., Steffes, M., Fiorotto, P., et al. (1993) Renal interstitial expansion in non-diabetic insulin-dependent diabetes mellitus. Kidney Int., 43, 661-667.
8. Alexopoulos, I., Savin, D., Hartley, R., et al. (1990) Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. Kidney Int., 37, 100-



文献

1. Klahr, S. (1992) Obstructive uropathy. In: *Cecil's textbook of Medicine*, 19th ed., W.B. Saunders Publishers, Philadelphia, pp579-584.
2. Sharma, A.K., Mauer, M., Kim, Y., et al. (1993) Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.*, 44, 774-788.
3. Wilson, D.R. and Klahr, S. (1993) Urinary tract obstruction. In: *Disease of the Kidney*, 5th ed., Little Brown, Boston, pp657-687.
4. Gillenwater, J.Y. (1992) The pathophysiology of urinary tract obstruction. In: *Campbell's Urology*, 6th ed., W.B. Saunders Publishers, Philadelphia, pp499-532.
5. 日本透析医学会統計調査委員会 (1996) わが国の慢性透析療法の実況(1994年12月31日現在). *透析会誌*, 29, 1-22.
6. United States Renal Data System 1993 Annual Data Report (1993) Incidence and causes of treated ESRD. *Am. J. Kidney Dis.*, 22(Suppl.2), 30-37.
7. Lane, P., Steffas, M., Fioretto, P., et al. (1993) Renal Interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.*, 43, 661-667.
8. Alexopoulos, E., Seron, D., Hartley, R., et al. (1990) Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. *Kidney Int.*, 37, 100-



- 109.
9. D'Amico, G., Ferrario, F. and Rastaldi, M.P. (1995)  
Tubulointerstitial damage in glomerular diseases:  
Its role in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.*, 26, 124-132.
10. Schreiner, G.F., Harris, K.P.G., Purkerson, M.L., et al.  
(1988) The immunological aspects of acute  
ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the  
kidney. *Kidney Int.*, 34, 487-493.
11. Nicolic-Paterson, D.J., Lan, H.Y., Hill, P.A., et al.  
(1994) Macrophages in renal injury. *Kidney Int.*,  
45, s79-s82.
12. Tamaki, K., Okuda, S., Ando, T., et al. (1994) TGF- $\beta$   
1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis  
of adriamycin nephropathy. *Kidney Int.*, 45, 525-  
536.
13. Yamamoto, T., Nakamura, T., Noble, N.A., et al.  
(1993) Expression of transforming growth factor  
- $\beta$  is elevated in human and experimental diabetic  
nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1814-  
1818.
14. Haralambous-Gasser, A., Chan, D., Walker, R.G., et  
al. (1993) Collagen studies in newborn rat kidneys  
with incomplete ureteric obstruction. *Kidney Int.*,  
44, 593-605.



15. Jones, C.L., Buch, S., Post, M., et al. (1991)  
Pathogenesis of interstitial fibrosis in chronic  
purine aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.*, 40,  
1020-1031.
16. Jones, C.L., Buch, S., Post, M., et al. (1992) Renal  
extracellular matrix accumulation in acute  
puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am.*  
*J. Pathol.*, 141, 1381-1396.
17. Kaneto, H., Morrissey, J. and Klahr, S. (1993)  
Increased expression of TGF- $\beta$  1 mRNA in the  
obstructed kidney of rats with unilateral ureteral  
ligation. *Kidney Int.*, 44, 313-321.
18. Border, W.A. and Ruoslahti, E. (1992) Transforming  
growth factor- $\beta$  in disease: The dark side of  
tissue repair. *J. Clin. Invest.*, 90, 1-7.
19. Roberts, A.B., McCune, B.K. and Sporn, M.B. (1992)  
TGF- $\beta$ : Regulation of extracellular matrix. *Kidney*  
*Int.*, 41, 557-559.
20. Kaneto, H., Morrissey, J., McCracken, R., et al.  
(1994) Enalapril reduces collagen type IV  
synthesis and expansion of the interstitium in the  
obstructed rat kidney. *Kidney Int.*, 45, 1637-  
1647.
21. Lafayette, R., Mayer, G. and Meyer, T. (1993) The  
effects of blood pressure reduction on cyclo-



- sporine nephrotoxicity in the rat. J. Am. Soc. Nephrol., 3, 1892-1899.
22. Diamond, J.R. and Anderson, S. (1990) Irreversible tubulointerstitial damage associated with chronic aminonucleoside nephrosis. Ameriolation by angiotensin I converting enzyme inhibition. Am. J. Pathol., 137, 1323-1332.
23. Majesky, M., Linder, V., Twardzik, D., et al. (1991) Production of transforming growth factor- $\beta$  1 during repair of arterial injury. J. Clin. Invest., 88, 904-910.
24. Gibbons, G.H., Pratt, R.E. and Dzau, V.J. (1992) Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. Hyperplasia. Autocrine transforming growth factor- $\beta$  1 expression determines growth response to angiotensin II. J. Clin. Invest., 90, 456-451.
25. Wolf, G., Mueller, E., Stahl, R., et al. (1993) Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor- $\beta$ . J. Clin. Invest., 92, 1366-1372.
26. Kagami, S., Border, W.A., Miller, D.E., et al. (1994) Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat



- glomerular mesangial cells. J. Clin. Invest., 93, 2431-2437.
27. Van Det, N.F., Tamsma, J.T., Van Den Born, J., et al. (1996) Differential effects of angiotensin II and transforming growth factor- $\beta$  on the production of heparan sulfate proteoglycan by mesangial cells in vitro. J. Am. Soc. Nephrol., 7, 1015-1023.
28. Vaughan Jr., E.D., Sweet, R.C. and Gillenwater. J.Y. (1970) Peripheral renin and blood pressure changes following unilateral ureteral occlusion. J. Urol., 104, 89-92.
29. Pimentel Jr., J.L., Martinez-Maldonado, M., Wilcox, J.N., et al. (1993) Regulation of renin-angiotensin system in unilateral ureteral obstruction. Kidney Int., 44, 390-400.
30. Gomez, R.A. and Norwood, V.F. (1995) Developmental consequences of renin-angiotensin system. Am. J. Kidney Dis., 26(3), 409-431.
31. Klahr, S., Harris, K. and Purkerson, M.L. (1988) Effects of obstruction on renal function. Pediatr. Nephrol., 2, 34-42.
32. Ichikawa, I. and Harris, R.C. (1991) Angiotensin actions in the kidney: Renewed insight into the old hormone. Kidney Int., 40, 583-596.
33. El-Dahr, S.S., Gee, J., Dipp, S., et al. (1993)



- Upregulation of renin-angiotensin system and  
downregulation of kallikrein in obstructive  
nephropathy. *Am. J. Physiol.*, 264, F874-F881.
34. 折笠精一 (1990) 先天性水腎症の基礎と臨床. 日泌尿会誌,  
80(13), 1875-1877
35. Olins, G.M., Corpus, V.M., McMahon, E.G., et al.  
(1992) In vitro pharmacology of a non-peptidic  
angiotensin II receptor antagonist, SC-51316. *J.  
Pharmacol. Exp. Ther.* 261,1037-1043.
36. Olins, G.M., Smits, G.J., Koepke, J.P., et al. (1993)  
In vivo pharmacology of SC-51316, a nonpeptidic  
angiotensin II receptor antagonist. *Am. J.  
Hypertens.*, 6, 619-625.
37. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step  
method of RNA isolation by acid guanidinium  
thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.  
Biochem.*, 162, 156-159.
- 38 Moller, J.C. and Skriver, E. (1985) Quantitative  
ultrastructure of human proximal tubules and  
cortical inter-stitium in chronic renal disease  
(hydronephrosis). *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.  
Histopathol.*, 406, 389-406.
39. Saito, T., Sumithran, E., Glasgow, E.F., et al. (1987)  
The enhancement of aminonucleoside nephrosis by  
the co-administration of protamine. *Kidney Int.*,



- 32, 691-699.
40. Qian, S.W., Kondaiah, P., Roberts, A.B., et al. (1990)  
cDNA cloning by PCR of rat transforming growth  
factor  $\beta$ -1. *Nucleic Acids Res.*, 18, 3059.
41. Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., et al. (1985)  
Various rat adult tissues express only one major  
mRNA species from the glyceraldehyde-3-phospha  
te dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids  
Res.*, 13, 1431-1442.
42. Rocco, M.V., Neilson, E.G., Hoyer, J.R., et al. (1992)  
Attenuated expression of epithelial cell adhesion  
molecules in murine polycystic kidney disease.  
*Am. J. Physiol.*, 262, F679-F686.
43. Tanaka, R., Kon, V., Yoshioka, T., et al. (1994)  
Angiotensin converting enzyme inhibitor modulates  
glomerular function and structure by distinct  
mechanisms. *Kidney Int.*, 45, 537-543.
44. Alpers, C., Hudkins, K., Gown, A., et al. (1992)  
Enhanced expression of "muscle-specific" actin in  
glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 41, 1134-1142.
45. Nagle, R.B., Kneiser, M.R., Bulger, R.E., et al. (1973)  
Induction of smooth muscle cell characteristics in  
renal interstitial fibroblasts during obstructive  
nephropathy. *Lab. Invest.*, 29, 422-427.
46. Nagle, R.B., Johnson, M.E. and Jervis, H.R. (1976)



- Proliferation of renal interstitial cells following injury induced by ureteral obstruction. *Lab. Invest.*, 35, 18-22.
47. Edwards, D.R., Waterhaus, P., Holman, M.L., et al. (1986) A growth responsive gene(16C8) in normal mouse fibroblasts homologous to a human collagenase inhibitor with erythroid-potentiating activity: Evidence for inducible and constitutive transcripts. *Nucleic Acids Res.*, 14, 8863-8878.
48. Wolf, G. and Neilson, E.G. (1994) Angiotensin II as a renal cytokine. *NIPS.*, 9, 40-42.
49. Bernstein, K.E. and Berk, B.C. (1993) The biology of angiotensin II receptors. *Am. J. Kidney Dis.*, 22, 745-754.
50. Chai, S.Y., Allen, A.M., Adam, W.R., et al. (1986) Local actions of angiotensin II: Quantitative in vitro autoradiographic localization of angiotensin II receptor binding and antagonism converting enzyme in target tissues. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 8(Suppl 10), s35-s39.
51. Chiu, A.T., McCall, D.E., Price, W.A., et al. (1990) Nonpeptidic angiotensin II receptor antagonists VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252, 711-718.



52. Taguma, Y., Kitamoto, Y., Futaki, G., et al. (1985)  
Effect of captopril on heavy proteinuria in  
azotemic diabetics. *N. Engl. J. Med.*, 313, 1617-  
1620.
53. Kakinuma, K., Kawamura, T., Billis, T., et al. (1992)  
Blood pressure-independent effect of angiotensin  
inhibition on vascular lesions of chronic renal  
failure. *Kidney Int.*, 42, 46-55.
54. Mulec, H., Johnsen, S.A. and Bjorck, S. (1994) Long-  
term enalapril treatment in diabetic nephropathy.  
*Kidney Int.*, 45, s141-s144
55. Liao, J. and Homey, C. (1992) Specific receptor-  
guanine nucleotide binding protein interaction  
mediates the release of endothelium-derived  
relaxing factor. *Circulation Res.*, 70, 1018-1026.
56. Nichols, A. and Sancar, A. (1992) Purification of  
PCNA as a nucleotide excision repair protein.  
*Nucleic Acids Res.*, 20, 2441-2446.
57. Nakajima, M., Hutchinson, HG., Fujinaga, M., et al.  
(1995) The angiotensin II type 2(AT<sub>2</sub>) receptor  
antagonizes the growth effects of the AT<sub>1</sub>  
receptor: Gain-of-function study using gene  
transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 10663-  
10667.
58. 石戸谷滋人、金藤博行、福崎篤 ほか(1996) 閉塞性腎症に



- おけるAngiotensin II receptorの発現. 日腎会誌,  
38(supple.), 73.
59. Kubes, P., Suzuki, M. and Granger, D. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 4651-4655.
60. Diamond, J.R., Kees-Folts, D., Ding, G., et al. (1994) Macrophages, monocyte chemoattractant peptide-1, and TGF- $\beta$ 1 in experimental hydro-nephrosis. *Am. J. Physiol.*, 266, F926-F933.
61. Yamamoto, T., Noble, N.A., Miller, D.E., et al. (1994) Sustained expression of TGF- $\beta$ 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int.*, 45, 916-927.
62. Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., et al. (1988) Latent high molecular weight complex of transforming growth factor  $\beta$ 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem.*, 263, 6407-6415.
63. Mizoi, T., Ohtani, H., Miyazono, K., et al. (1993) Immunoelectron microscopic localization of transforming growth factor  $\beta$ 1 and latent transforming growth factor  $\beta$ 1 binding protein in human gastrointestinal carcinomas: Qualitative difference between cancer cells and stromal cells.



Cancer Res., 53, 183-190.

64. Gonzalez-Avila, G., Vadillo-Ortega, F. and Perez-Tamayo, R. (1988) Experimental diffuse interstitial renal fibrosis: A biochemical approach. Lab. Invest., 59, 245-252.





図1 UUOラットにおける間質領域の相対的ボリューム

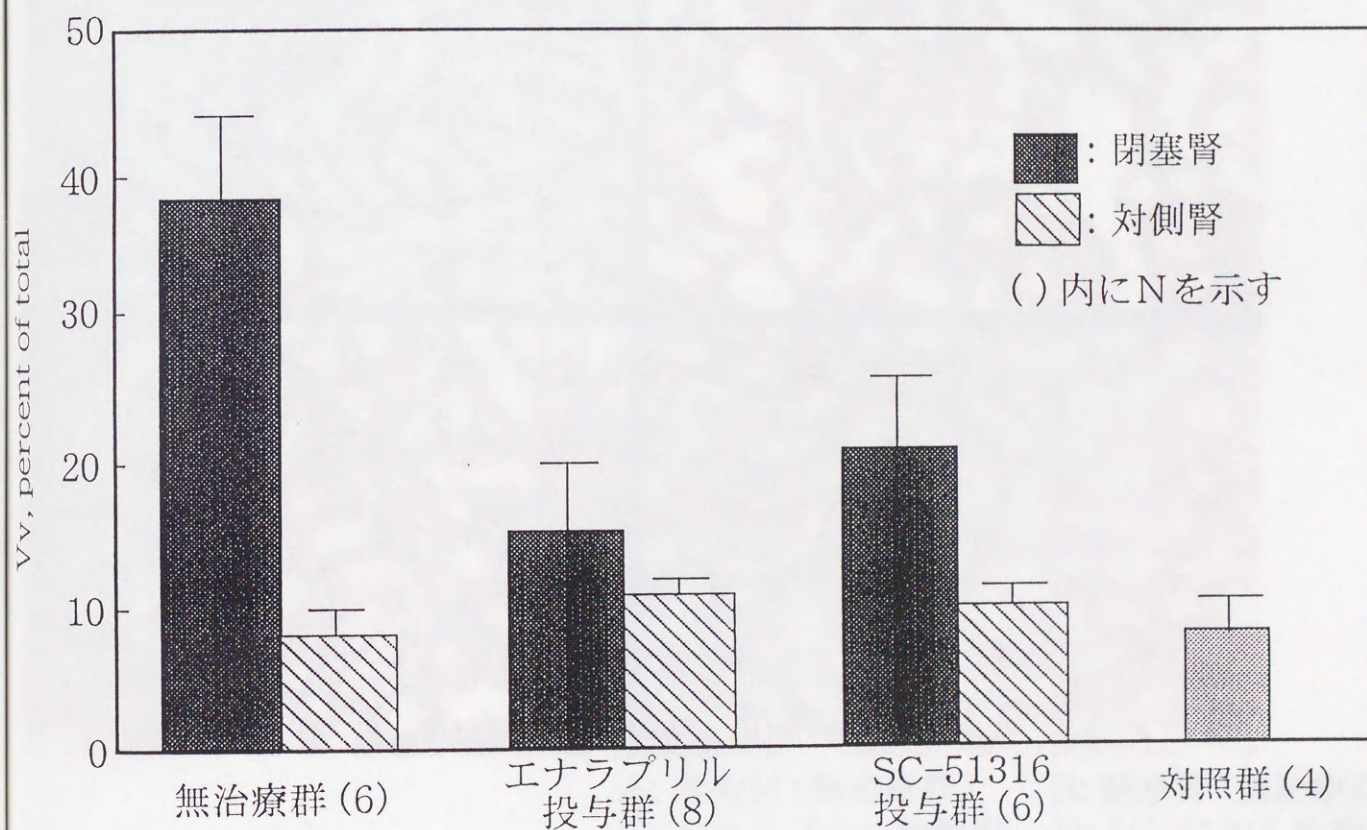
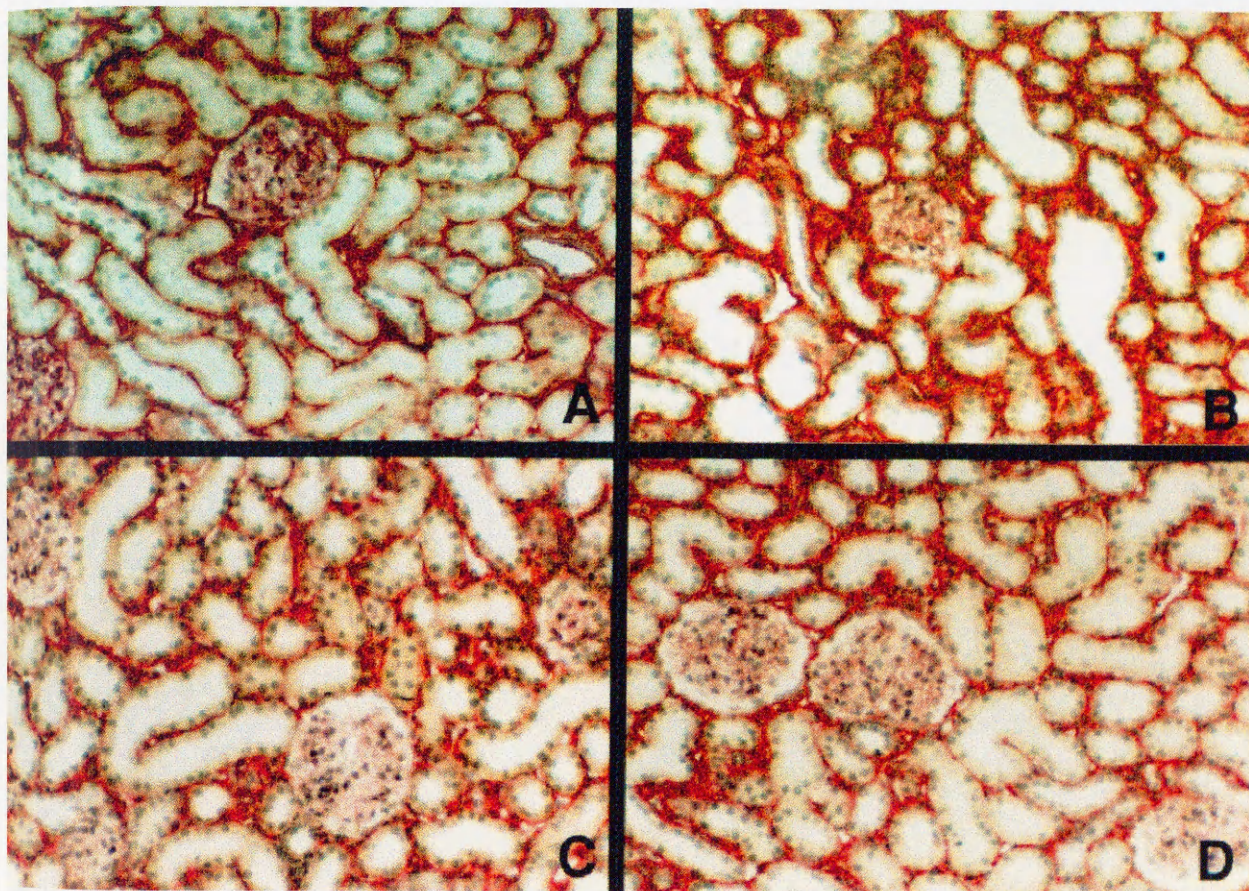




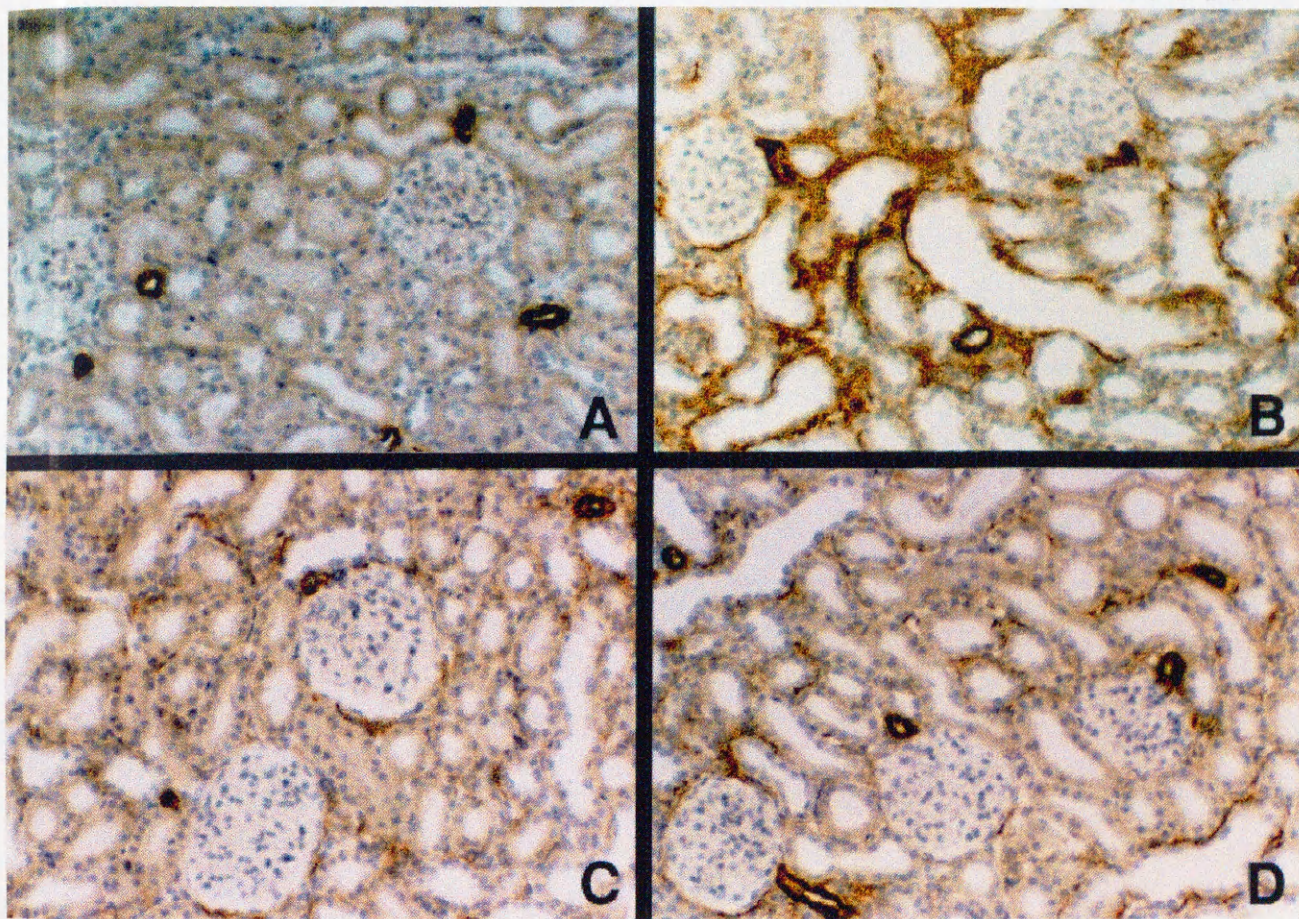
図 2- I UUO ラットにおけるコラーゲンIV蛋白の発現



A: 対側腎 (無治療群)      B: 閉塞腎 (無治療群)  
C: エナラプリル治療群      D: SC-51316 治療群



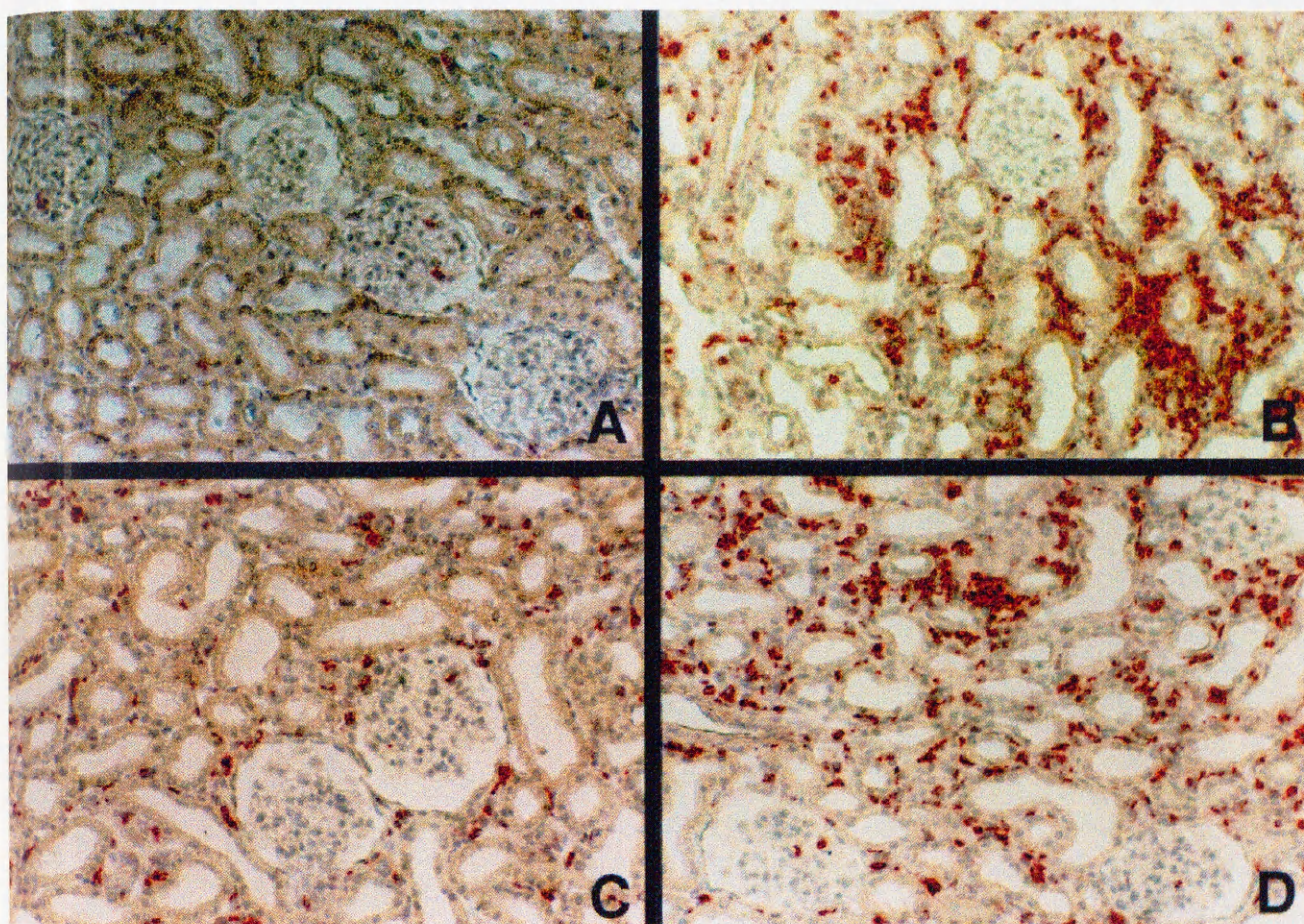
図 2- II UUO ラットにおける  $\alpha$  SMA の発現



A: 対側腎 (無治療群)      B: 閉塞腎 (無治療群)  
C: エナラプリル治療群      D: SC-51316 治療群



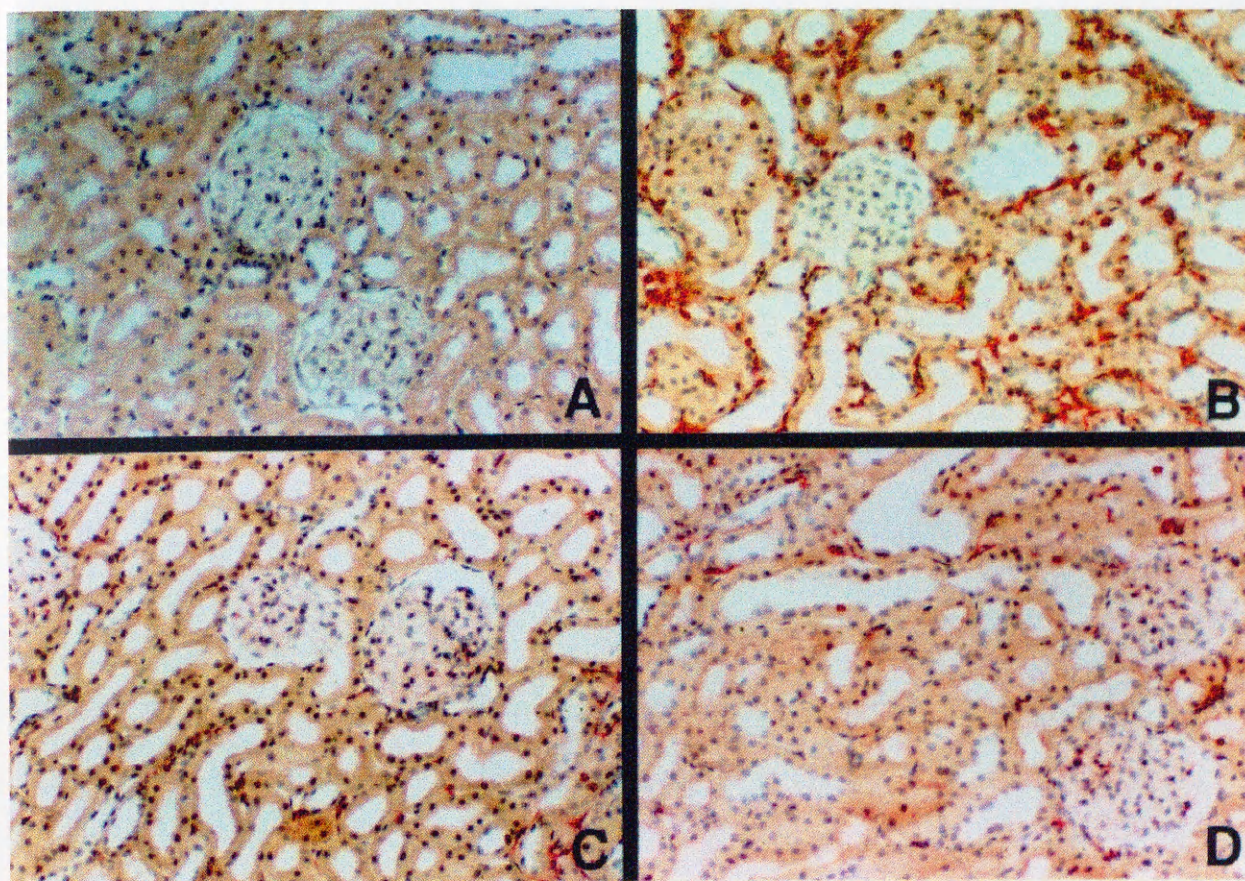
図 2- III UUO ラットにおける単球／マクロファージ浸潤



A: 対側腎（無治療群）      B: 閉塞腎（無治療群）  
C: エナラプリル治療群      D: SC-51316 治療群



図 2-IV UUO ラットにおける PCNA の発現



A: 対側腎 (無治療群)      B: 閉塞腎 (無治療群)  
C: エナラプリル治療群      D: SC-51316 治療群



図3 UUO ラットにおける ED-1 陽性細胞数

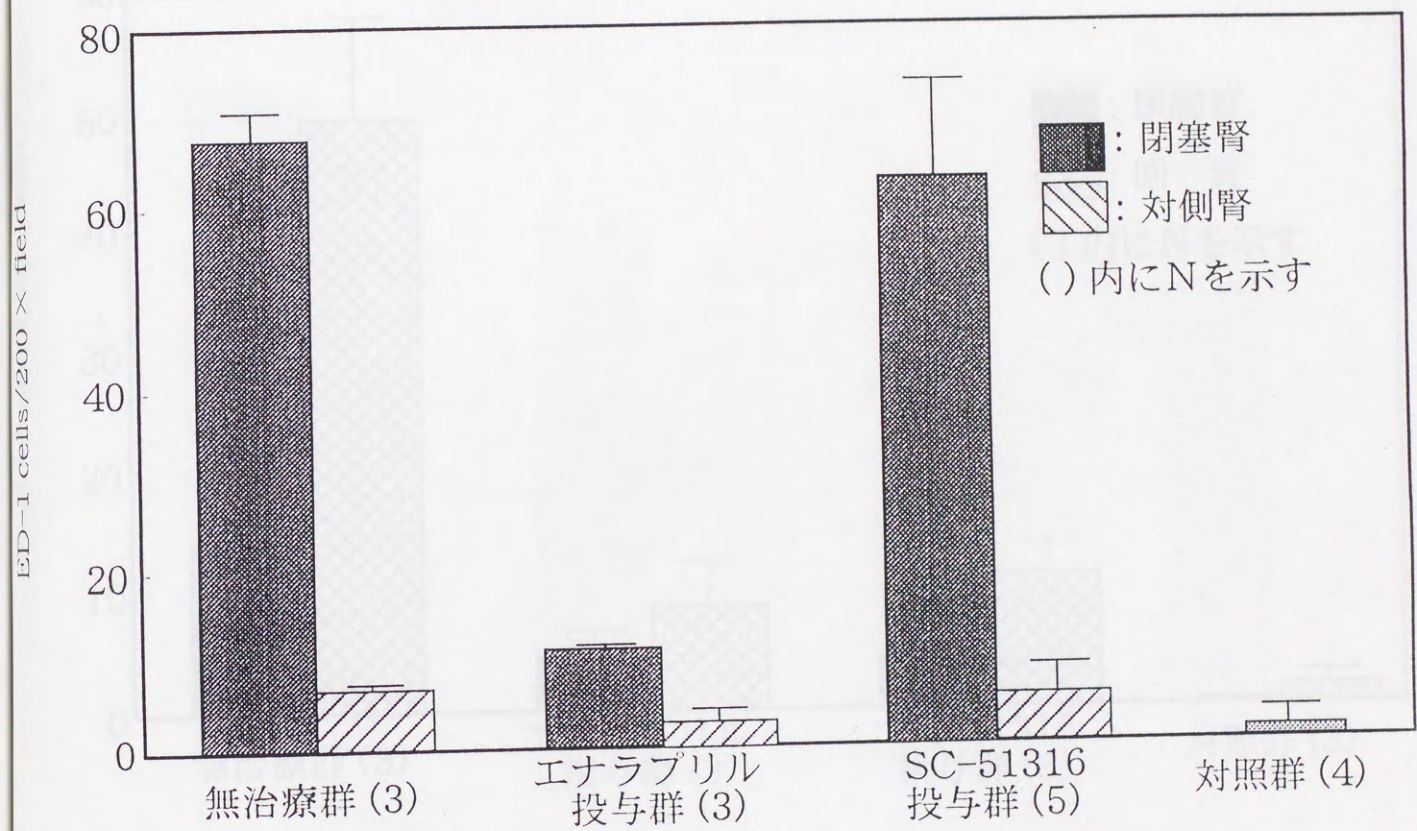




図4 UUO ラット閉塞腎におけるPCNA 陽性核数

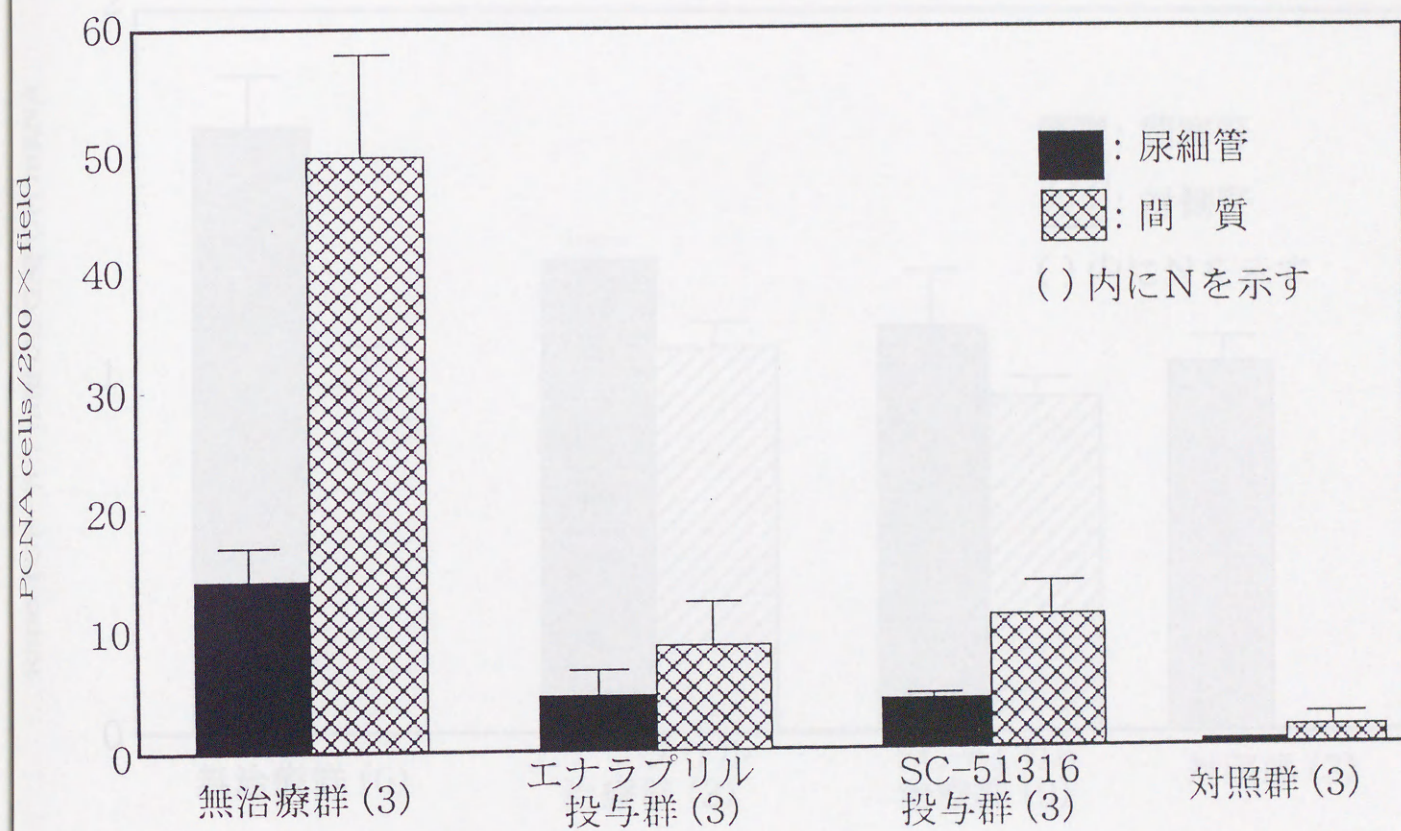




図5 UUO ラットにおける TGF- $\beta$ 1 mRNA レベル

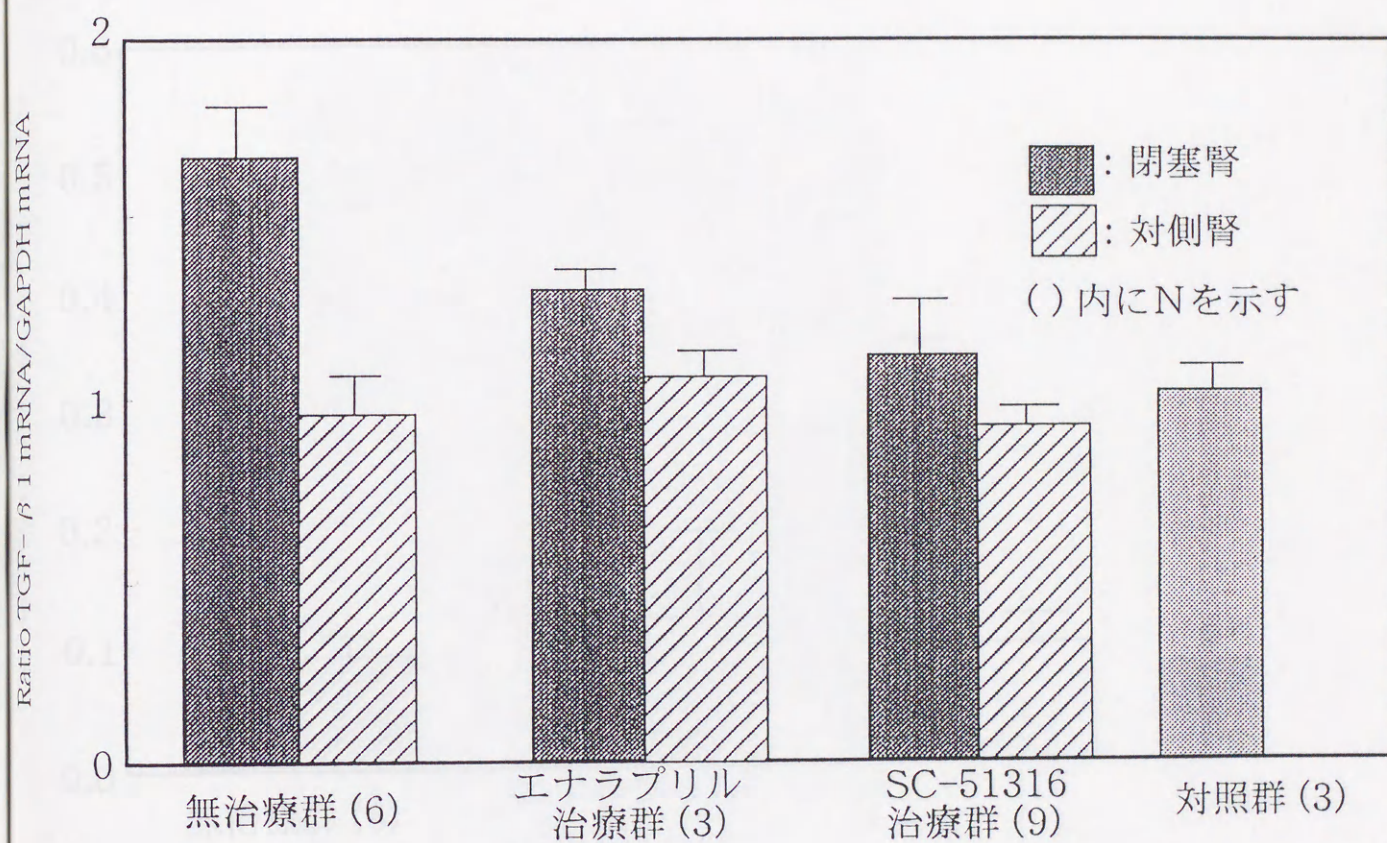




図 6 UUO ラットにおけるコラーゲンIV mRNA レベル

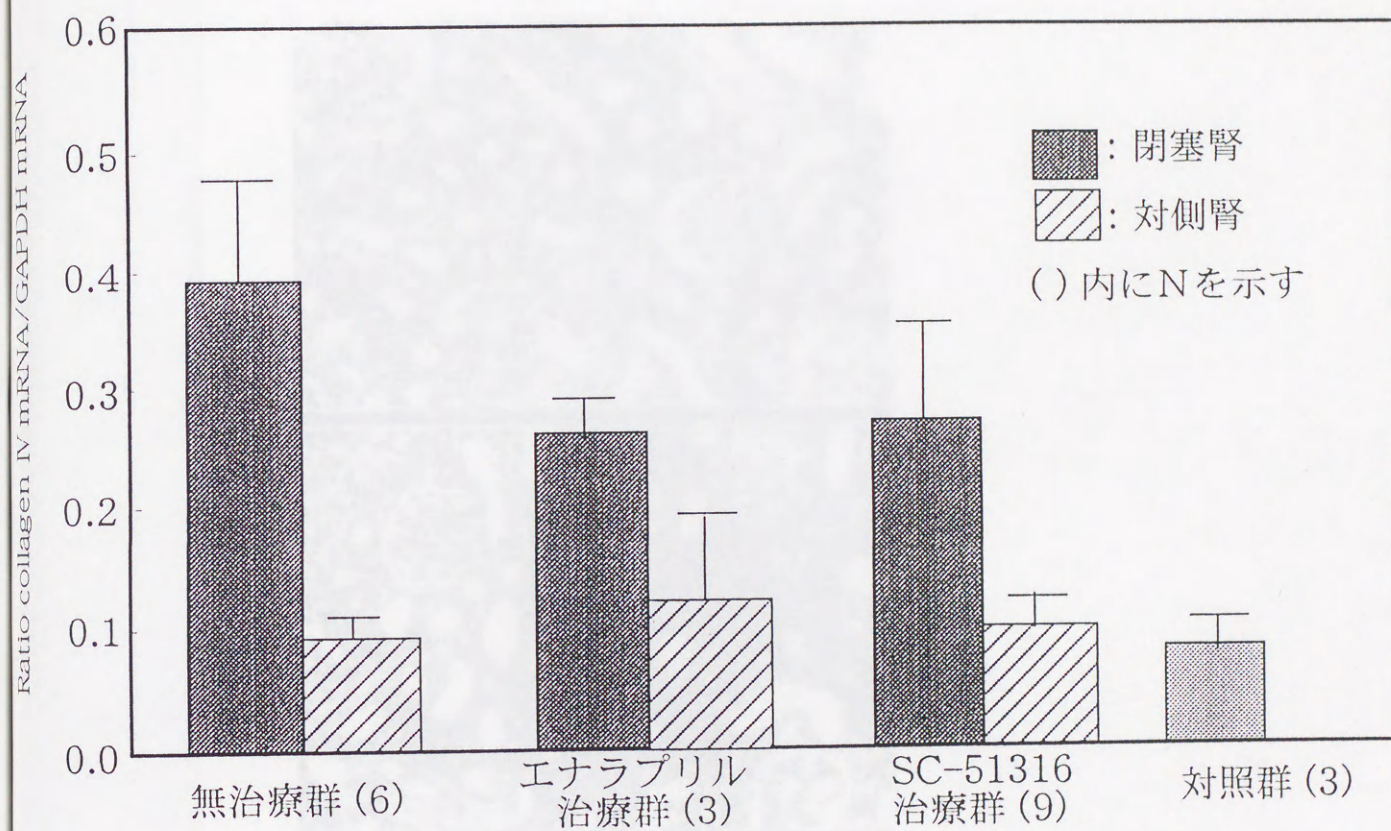
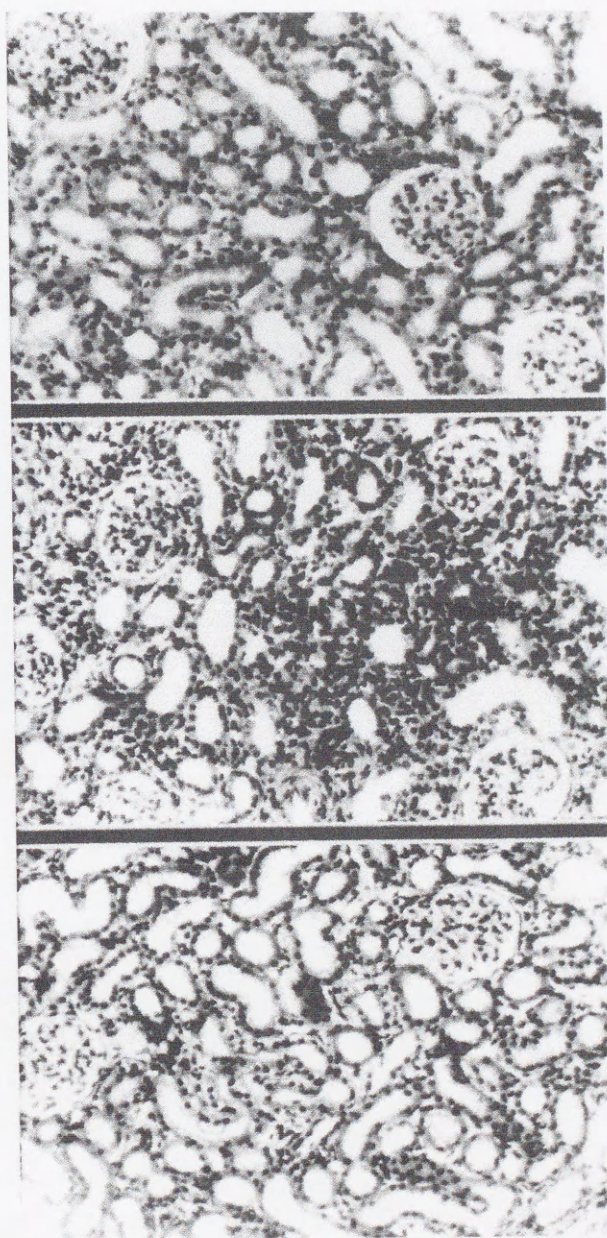




図 7 ラット閉塞腎における遅延型治療の効果



上：閉塞腎（無治療 5 日間）  
中：閉塞腎（無治療 10 日間）  
下：閉塞腎（遅延型治療）



図8 間質ボリュームにおける遅延型治療の効果

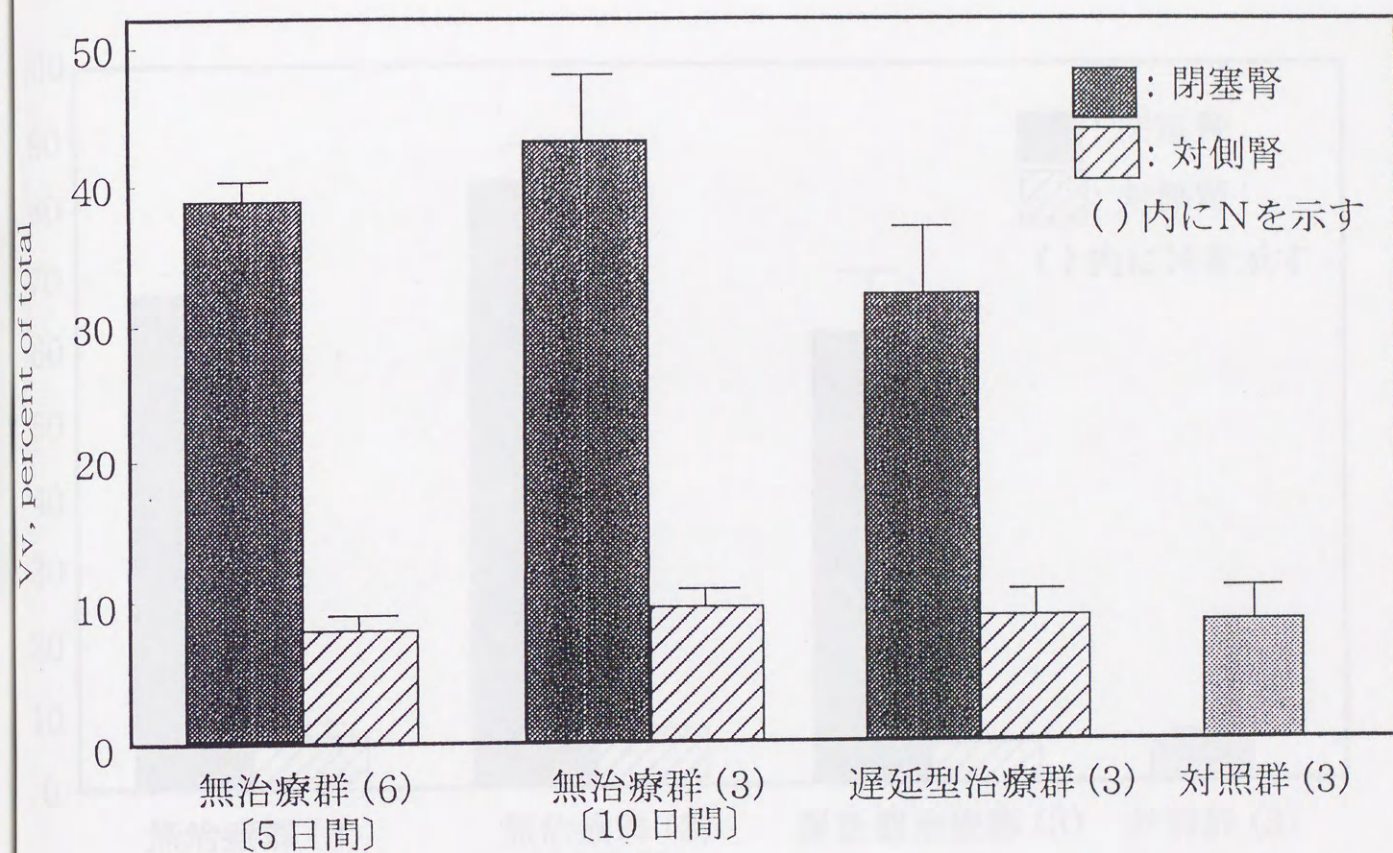




図 9 単球／マクロファージ浸潤における遅延型治療の効果

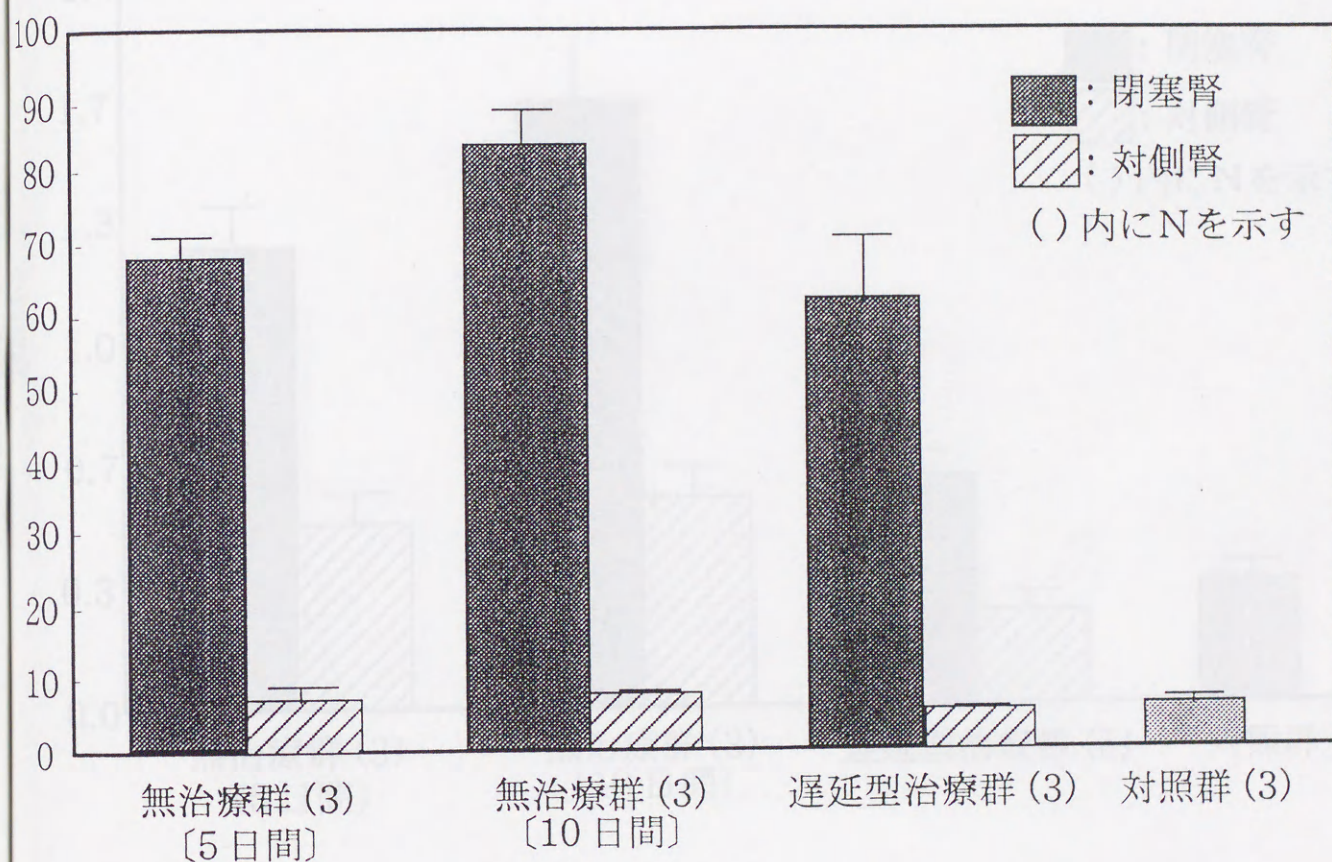




図 10 TGF- $\beta$ 1 mRNA における遅延型治療の効果

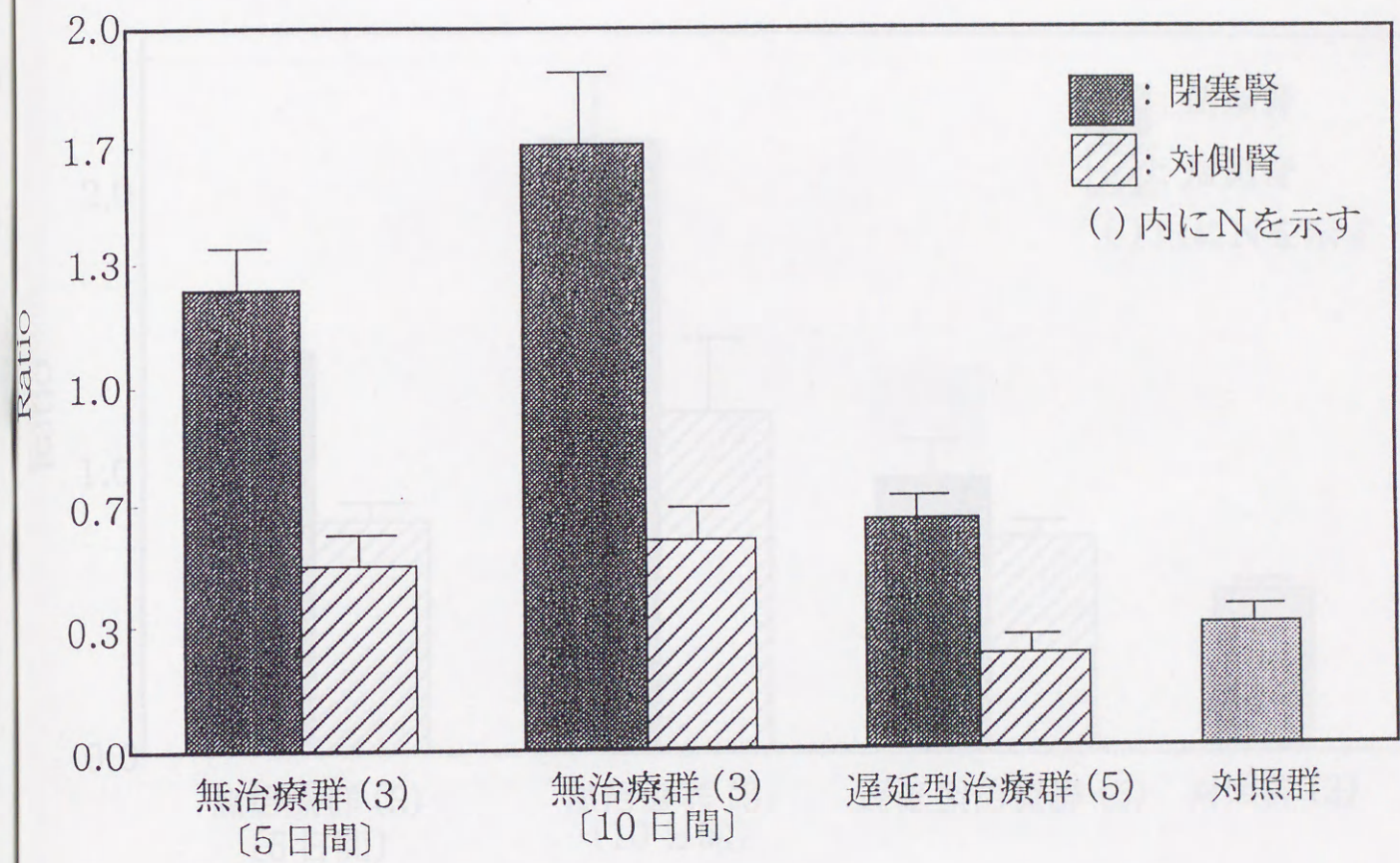




図 11 TIMP-1 mRNA における遅延型治療の効果

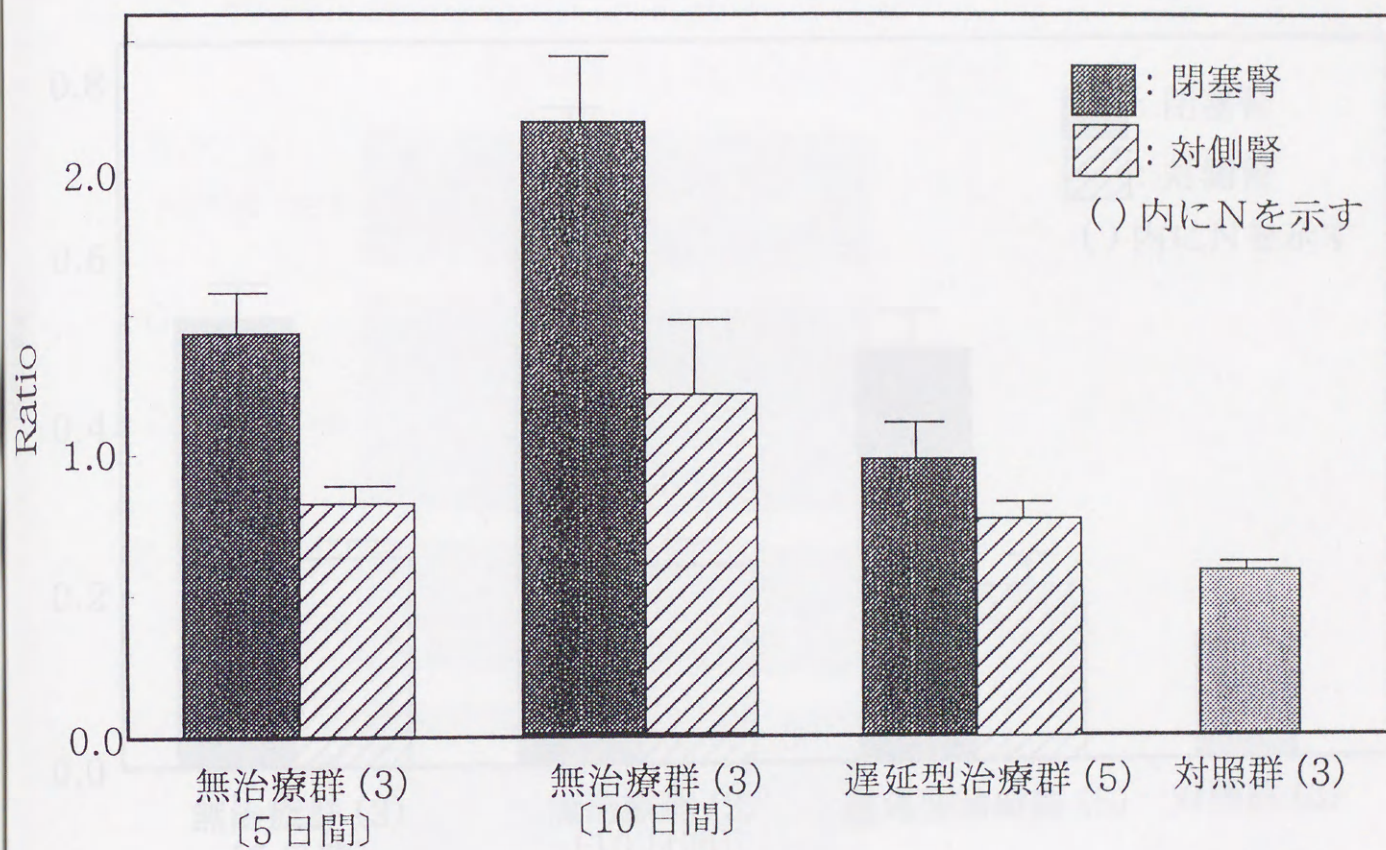




図 12 コラーゲンIV mRNAにおける遅延型治療の効果

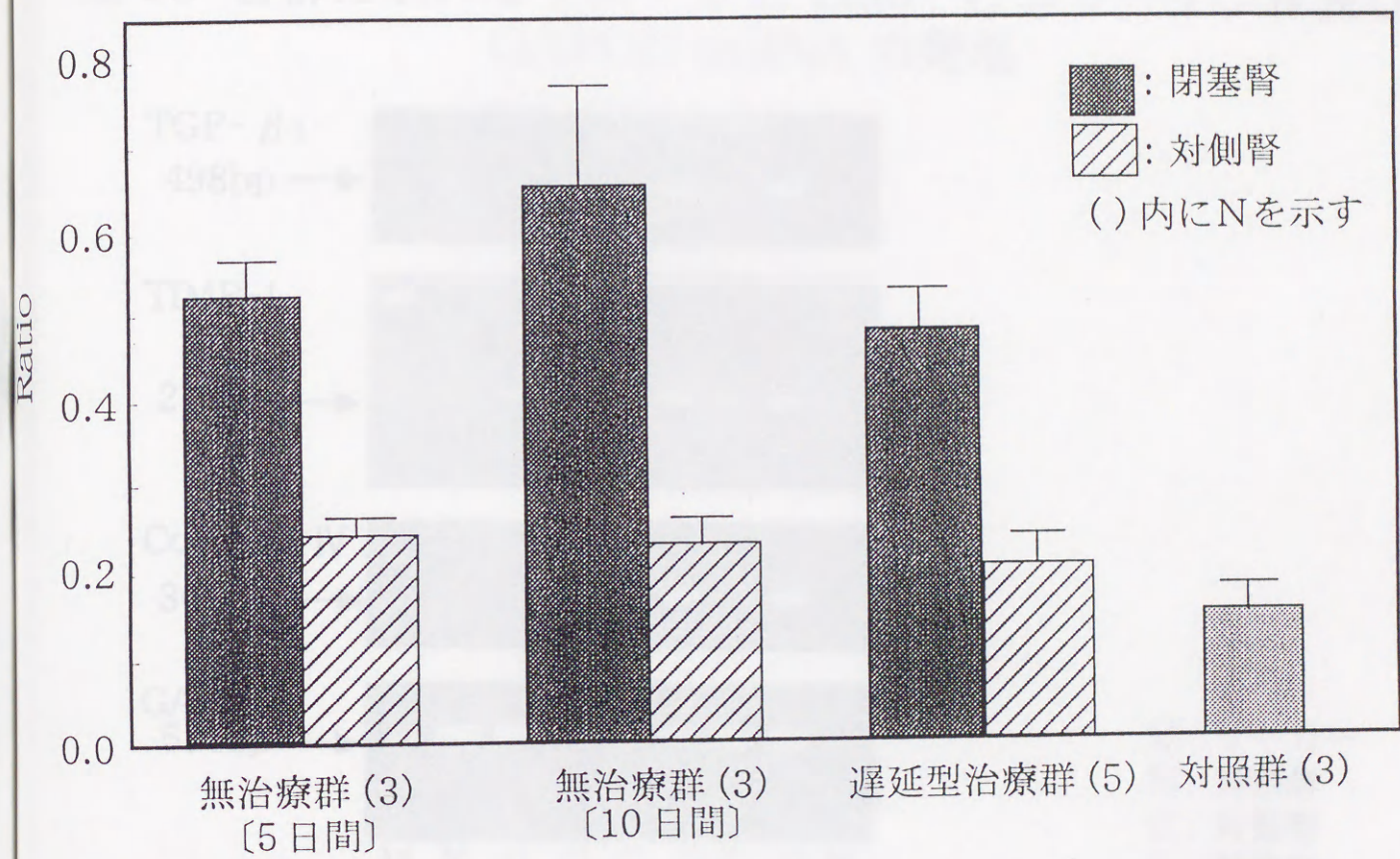
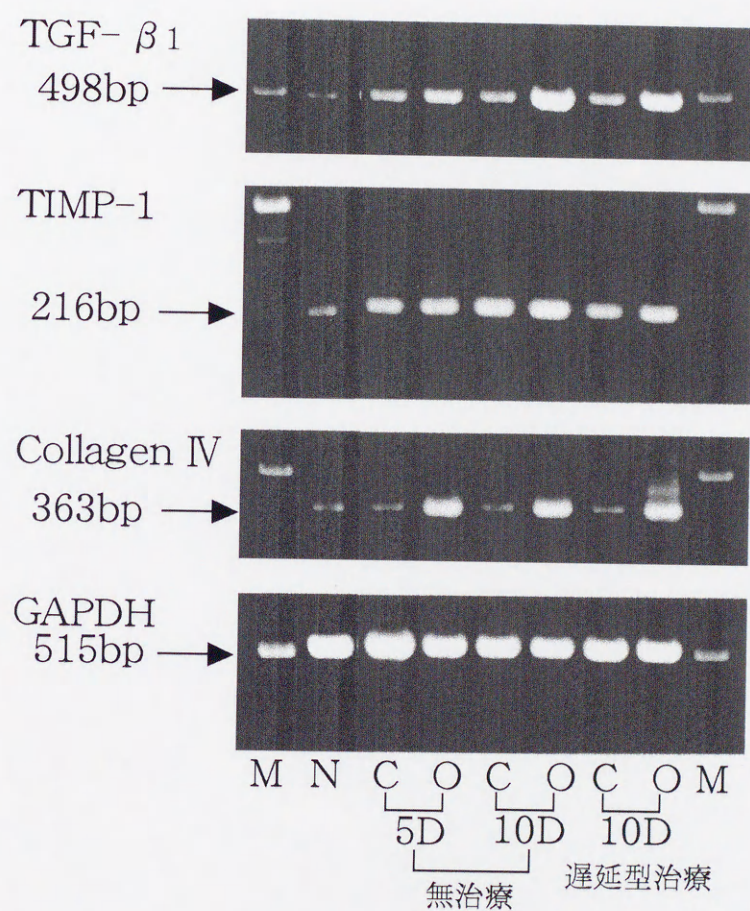




図 13 各群における TGF- $\beta$  1, TIMP-1, コラーゲンIV及び GAPDH mRNA の発現



M: マーカー  
N: 対照群  
C: 対側腎  
O: 閉塞腎



表1 UUO ラットにおける平均動脈圧及び血漿レニン活性

治 療	MAP mmHg	N	PRA ng/hr/ml	N
対 照 群	121 ± 1	3	4.3 ± 0.8	4
無 治 療 群	124 ± 2	3	8.4 ± 0.5	6
SC-51316 投与群	124 ± 1	3	58.6 ± 4.8	5
エナラプリル投与群	100 ± 1	3	69.0 ± 4.9	3

(平均値 ± 標準偏差)



表2 UUO ラットにおけるマトリックス・スコア

治 療		スコア				平均スコア	N
		0	1	2	3		
コラーゲンIV	無 治 療	0	0	18 ± 8	81 ± 8	2.81 ± 0.08	3
	エナラプリル	3 ± 2	25 ± 10	58 ± 8	13 ± 3	1.85 ± 0.13	3
	SC-51316	0	20 ± 13	63 ± 8	17 ± 6	1.97 ± 0.19	3
α SMA	無 治 療	0	0	52 ± 3	47 ± 3	2.47 ± 0.03	3
	エナラプリル	47 ± 13	48 ± 16	8 ± 8	0	0.65 ± 0.13	3
	SC-51316	38 ± 10	45 ± 10	15 ± 5	1 ± 1	0.80 ± 0.18	3

(平均値 ± 標準偏差)



表3 マトリックス・スコアにおける遅延型治療の効果

条 件	平均スコア	N
コラーゲンIV		
Day 5 無治療	$2.32 \pm 0.06$	3
Day 10 無治療	$2.77 \pm 0.03$	3
Day 10 遅延型治療	$2.07 \pm 0.13$	3
$\alpha$ SMA		
Day 5 無治療	$2.58 \pm 0.04$	3
Day 10 無治療	$2.60 \pm 0.04$	3
Day 10 遅延型治療	$2.17 \pm 0.07$	3

(平均値 $\pm$ 標準偏差)



表3 アイリッシュ・スコープにおける経路壁面効果の測定

条件	平均スコア	N
Day 10 経路壁面効果	2.07 ± 0.13	3
Day 10 無効果	2.74 ± 0.03	3
Day 5 無効果	2.32 ± 0.06	3
Day 10 経路壁面効果	2.17 ± 0.07	3
Day 10 無効果	2.60 ± 0.04	3
Day 5 無効果	2.28 ± 0.04	3

(平均値 ± 標準偏差)



表3 アイリッシュ・スコープ・スウェーデン・スウェーデンの果樹の栽培状況

果樹の種類	栽培面積 (ha)	平均収量 (kg/ha)	N
Day 10 遅延型治療	3	2.05 ± 0.13	3
Day 10 無治療	3	2.77 ± 0.03	3
Day 5 無治療	3	2.32 ± 0.06	3
Day 10 遅延型治療	3	2.15 ± 0.07	3
Day 10 無治療	3	2.60 ± 0.04	3
Day 5 無治療	3	2.28 ± 0.04	3

(単位: kg/ha)



